



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

SUSAN SUELLEN BARROS

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE EUDRAGIT RL 100
CONTENDO TAMOXIFENO COMO AGENTE ANTITUMORAL**

CEILÂNDIA, DF
2014

SUSAN SUELLEN BARROS

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE EUDRAGIT RL 100
CONTENDO TAMOXIFENO COMO AGENTE ANTITUMORAL**

Monografia de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Bacharel
em Farmácia, na Universidade de
Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes

CEILÂNDIA, DF

2014

SUSAN SUELLEN BARROS

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE EUDRAGIT RL 100
CONTENDO TAMOXIFENO COMO AGENTE ANTITUMORAL**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento
(FCe/ Universidade de Brasília)

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes
(FCe/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti
(FCe/Universidade de Brasília)

CEILÂNDIA, DF

2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por seu imensurável amor e pela graça à mim concedida por chegar até aqui.

Aos meus pais, Francisco e Suely, pelo amor, carinho, compreensão e auxílio dados durante todos os anos de vida. Agradeço por todos os ensinamentos e exemplos de esforço, superação e sucesso.

Ao meu irmão, Fillipe, por ser meu melhor amigo e companheiro em todos os momentos. Agradeço pela cooperação com a revisão ortográfica deste trabalho.

À Tawana, amiga querida, que me apoiou em todos os momentos, não só na realização deste trabalho, mas também durante toda a graduação. Agradeço pela amizade, carinho, sinceridade e companheirismo ao longo dessa jornada.

Aos queridos Ana Paula e João Bosco por todo o apoio e auxílio no decorrer da graduação.

Às amigas Camyla e Naiara, que me assistiram em diversos momentos, não só da finalização deste trabalho, mas também pela amizade, suporte e diversão à mim proporcionados ao longo da graduação.

À professora Dr.^a Graziella A. Joanitti pela disponibilidade e paciência em me conduzir na realização do ensaio de viabilidade celular.

Aos técnicos do Laboratório de Química UnB-FCE Diego Dias e Marcos Leite pela ajuda na parte laboratorial deste trabalho.

Ao professor Dr. Anderson J. Gomes, orientador de iniciação científica durante três anos e co-orientador deste trabalho, agradeço pela oportunidade, paciência, confiança e por todo o aprendizado à mim concedido. Sua cooperação foi significativa para corroborar meu aprendizado no processo de formação acadêmica.

Ao professor Dr. Paulo Barboni, orientador nesta monografia, agradeço por ter me aceitado como orientanda, pela paciência e por ter sido atencioso e prestativo em me direcionar durante a realização deste trabalho.

À todos os professores da UnB-FCE que contribuíram para a minha formação acadêmica.

RESUMO

Introdução: O câncer é considerado uma questão de saúde pública a nível mundial. Dentre os tipos mais incidentes destaca-se o câncer de mama, que representa a principal causa de óbito do sexo feminino. As pesquisas para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada/sustentada têm se tornado uma alternativa promissora para o tratamento do câncer. O polímero Eudragit RL 100 foi utilizado para a produção das micropartículas. Entre os fármacos utilizados na hormonioterapia antineoplásica, destaca-se o tamoxifeno, anti-estrógeno não esteroideal pertencente à classe dos moduladores seletivos do receptor de estrógeno e responsável por causar diversos efeitos indesejáveis. Objetivo: produzir e caracterizar micropartículas de Eudragit RL 100 contendo tamoxifeno. Metodologia: as MPs foram produzidas através do método de evaporação do solvente modificado. Resultados e discussão: As MPs apresentaram eficiência de encapsulamento de 27%, diâmetro médio de $2,03 \pm 0,4 \mu\text{m}$, e potencial zeta de +58,8 mV. O estudo de estabilidade demonstrou que as micropartículas apresentam baixa tendência à agregação. O perfil de liberação do tamoxifeno apresentou-se sustentado e bifásico. O espectro de FTIR confirmou a presença de tamoxifeno no interior das micropartículas. A avaliação citotóxica em linhagem de células tumorais MCF-7 revelou uma pequena taxa de morte celular das células tratadas com MPs-TMX em comparação com o fármaco livre. Conclusão: os estudos iniciais indicam que as MPs-TMX possuem características promissoras como sistema de liberação de fármacos. Verifica-se a necessidade de otimização do método de preparo para aumento da eficiência de encapsulamento, continuação dos testes de caracterização e do estudo de citotoxicidade.

Palavras-chave: câncer de mama, micropartículas, Eudragit RL 100, tamoxifeno, sistema de liberação de fármacos.

ABSTRACT

Introduction: Cancer is considered a health public issue worldwide. Among the cancer types, breast cancer is the most incident type, leading to the main death cause for women. Advances in research for the development of controlled/sustained release systems have become a promising alternative for the treatment of cancer. Eudragit RL 100 polymer was used to produce microparticles. Among the antineoplastic drugs used in hormone therapy, there is tamoxifen, a nonsteroidal anti-estrogens belonging to the class of selective estrogen receptor modulators and responsible for causing many undesirable effects. **Objective:** production and characterization of Eudragit RL 100 microparticles containing tamoxifen. **Methodology:** MPs were produced from the adaptation solvent evaporation method. **Results and discussion:** The MPs had 27% entrapment efficiency, mean size distribution of $2.03 \pm 0.4 \mu\text{m}$ and zeta potential of +58.8 mV. The stability study showed a median stability of microparticles with slight tendency to aggregation. The tamoxifen release profile was sustained and biphasic. The FTIR spectrum confirmed the presence of tamoxifen within the microparticles. The cytotoxic studies in tumor cell line MCF-7 revealed a small rate of cell death by TMX-MPs treatment in comparison with free drug. **Conclusion:** Initial studies indicate that TMX-MPs have promising characteristics as a drug delivery system. There is a need for optimization of the preparation method for increasing the entrapment efficiency, continuation of the study of characterization and cytotoxicity tests.

Keywords: breast cancer, microparticles, Eudragit RL 100, tamoxifen, drug delivery system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspectos gerais do processo de carcinogênese.....	16
Figura 2: Principais modalidades terapêuticas para o tratamento do câncer.....	23
Figura 3: Esquema representativo das fases do ciclo celular.....	23
Figura 4: Estrutura química do fármaco tamoxifeno.....	24
Figura 5: Representação do mecanismo de ação do tamoxifeno nas células da mama.....	27
Figura 6: Representação esquemática de microcápsulas (a) e microesferas (b).....	31
Figura 7: Estrutura química do Eudragit RL 100.....	35
Figura 8: Esquema de preparo das micropartículas de Eudragit RL 100 contendo tamoxifeno.....	41
Figura 9: Curva de calibração do tamoxifeno em metanol.....	44
Figura 10: Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das micropartículas de Eudragit RL 100 vazias.....	49
Figura 11: Potencial ζ das micropartículas vazias de Eudragit RL 100.....	50
Figura 12: Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das micropartículas de Eudragit RL 100 contendo tamoxifeno.....	50
Figura 13: Potencial ζ das micropartículas de Eudragit RL® 100 contendo tamoxifeno.....	51
Figura 14: Perfil de liberação do tamoxifeno microencapsulado em polímeros de Eudragit RL 100 durante 336 horas a 37,0 °C.....	51
Figura 15: Espectro de absorção do polímero Eudragit RL 100 em metanol	53
Figura 16: Espectro de absorção de micropartículas vazias de Eudragit RL 100 em solução aquosa	52
Figura 17: Espectro de absorção do tamoxifeno livre em solução orgânica de metanol	53
Figura 18: Espectro de absorção de micropartículas contendo tamoxifeno em solução aquosa	53
Figura 19: Espectro de absorção das MPs-TMX em metanol.....	54
Figura 20: Espectro de FTIR das MPs-TMX, TMX e EDGT.....	55
Figura 21: Perfil de estabilidade. Variação da distribuição de diâmetro hidrodinâmico das micropartículas de Eudragit RL 100 contendo tamoxifeno a 37,0 °C durante 12 dias.....	56
Figura 22: Perfil de estabilidade. Variação do potencial ζ das micropartículas de Eudragit RL 100 contendo tamoxifeno a 37,0°C durante 12 dias.....	58

Figura 23: Ensaio de viabilidade celular utilizando micropartículas de Eudragit RL 100 cheias e vazias em células da linhagem MCF-7..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa dos dez tipos de câncer mais incidentes em mulheres, exceto pele não melanoma, no Brasil em 2014.	18
Tabela 2. As principais classes de fármacos antineoplásicos baseadas no ciclo celular.....	24
Tabela 3. Descrição dos reagentes utilizados com seus respectivos fabricantes.	39
Tabela 4. Descrição dos equipamentos utilizados com seus respectivos fabricantes	40
Tabela 5. Apresentação dos dados referente à distribuição de tamanho, Pdl e potencial ζ ..	50
Tabela 6. Bandas de absorção em FTIR de MPs-TMX, TMX livre e EDGT e suas respectivas interações.....	55

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo da porcentagem da eficiência de encapsulamento.	43
Equação 2. Cálculo para determinação da concentração de tamoxifeno encapsulado	43
Equação 3. Equação para determinar a densidade celular.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF1	Activation Function 1 (Função de ativação 1)
AF2	Activation Function 2 (Função de ativação 2)
ANOVA	Análise de Variância
BR	Brasil
BRCA 1	Breast Cancer 1 (Câncer de Mama 1)
BRCA 2	Breast Cancer 2 (Câncer de Mama 2)
CH	China
DLS	Dynamic Light Scattering (Espalhamento Dinâmico da Luz)
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
EDGT	Eudragit RL 100
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EE%	Eficiência de Encapsulamento
EPR	Enhanced permeability and retention (aumento da permeabilidade e retenção)
EREs	Elementos de resposta ao estrógeno
ER α	Estrogen Receptor α (Receptor de estrógeno subtipo α)
ER β	Estrogen Receptor β (Receptor de estrógeno subtipo β)
EUA	Estados Unidos da América
Ex.	Exemplo
FDA	Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Medicamentos)
FSH	Follicle-stimulating hormone (Hormônio folículo estimulante)
FTIR	Fourier Transform Infrared (Infravermelho com transformada de Fourier)
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidermal Humano)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IR	Infrared (Infravermelho)
JAP	Japão
KBr	Brometo de potássio

LH	Luteinizing hormone (Hormônio luteinizante)
MCF-7	Michigan Cancer Foundation- 7
MPs	Micropartículas
MPs-TMX	Micropartículas contendo tamoxifeno
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-triazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium
NIH	National Institutes of Health (Institutos Nacionais de Saúde)
p53	proteína p53
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato salino)
PdI	Polidispersity Index (Índice de polidispersão)
PRL	Prolactin (Prolactina)
REs	Receptores de estrógeno
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SIM	Serviço de Informação sobre Mortalidade
TGF- β	Transforming growth factor β (Fator transformador do crescimento β)
TMX	Tamoxifeno
UK	United Kingdom (Reino Unido)
UV-Vis	Ultravioleta-visível
WCRF Câncer)	World Cancer Research Fund (Fundação Mundial de Pesquisa sobre Câncer)
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. O câncer.....	14
1.1.1. Aspectos Gerais	14
1.1.2. Perfil Epidemiológico	16
1.1.3. Câncer de Mama	17
1.2. Tratamento.....	19
1.2.1. Quimioterápicos antineoplásico.....	22
1.2.2. Tamoxifeno	24
1.2.2.1. Mecanismo de ação	25
1.2.2.2. Potenciais efeitos indesejáveis e reações adversas	27
1.3. Considerações sobre Nanotecnologia.....	29
1.3.1. Sistemas de Liberação de Fármacos	30
1.3.2. Eudragit RL 100®.....	34
1.3.3. Nanotecnologia aplicada ao tratamento do câncer	36
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivos gerais	38
3.2. Objetivos específicos	39
4. METODOLOGIA.....	39
4.1. Materiais.....	39
4.1.1. Reagentes.....	39
4.1.2. Equipamentos	40
4.2. Métodos	41
4.2.1. Preparação das Micropartículas.....	41
4.2.2. Preparação da solução tampão fosfato salino (PBS).....	42
4.2.3. Avaliação da distribuição de diâmetro hidrodinâmico e potencial ζ	42
4.2.4. Avaliação da eficiência de encapsulamento.....	42
4.2.5. Avaliação do perfil de liberação do fármaco.....	44
4.2.6. Avaliação espectroscópica na região UV/Vis	45
4.2.7. Avaliação espectroscópica na região do infravermelho	45
4.2.8. Avaliação do perfil de estabilidade	45
4.2.9. Ensaio de viabilidade celular.....	46

4.2.9.1. Cultivo celular.....	46
4.2.9.2. Contagem de células.....	47
4.2.9.3. Tratamento das células	48
5. RESULTADOS	48
5.1. Avaliação da distribuição de tamanho e potencial ζ	48
5.1.1. Micropartículas vazias.....	48
5.1.2. Micropartículas contendo tamoxifeno.....	50
5.2. Avaliação da eficiência de encapsulamento	51
5.3. Avaliação da cinética de liberação do fármaco.....	52
5.4. Avaliação espectroscópica na região UV/vis	53
5.5. Avaliação espectroscópica na região do infravermelho	55
5.6. Avaliação do perfil de estabilidade	57
5.7. Análise de viabilidade celular.....	58
6. DISCUSSÃO	59
6.1. Análise de distribuição de diâmetro hidrodinâmico e potencial ζ	59
6.2. Análise da eficiência de encapsulamento	61
6.3. Análise da cinética de liberação do fármaco.....	61
6.4. Avaliação espectroscópica na região UV/Vis.....	62
6.5. Avaliação espectroscópica na região do infravermelho	63
6.6. Análise do perfil de estabilidade	63
6.7. Análise da viabilidade celular.....	64
7. CONCLUSÃO.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

1.1. O câncer

1.1.1. Aspectos gerais

O termo câncer é atribuído a um conjunto de mais de 100 doenças, que apresentam como característica comum o crescimento desordenado das células, que podem acometer tecidos e órgãos. Utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina, essa denominação vem do grego *karkínos*, que significa “caranguejo”, empregada em analogia ao modo de crescimento infiltrante do tumor, comparando-o às pernas do crustáceo (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Sabe-se que o câncer apresenta etiologia multifatorial e necessita de múltiplas etapas para o seu desenvolvimento. Sua incidência pode sofrer variações de acordo com a idade, etnia, fatores geográficos e condições genéticas (KUMAR, *et. al.*, 2008). Esses fatores somados à exposição a agentes carcinogênicos têm a capacidade de promover mutações em genes denominados protooncogenes, os quais são inativos em células normais. Entretanto, quando ativados, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, sendo capazes de funcionar de forma autônoma, sem a necessidade de sinais promotores do crescimento, e são responsáveis pela transformação das células normais em células cancerosas (ALMEIDA, *et. al.*, 2005).

Além dos protooncogenes, os genes supressores de tumor, os genes reguladores da apoptose e os genes envolvidos no reparo ao DNA também estão relacionados ao desenvolvimento do câncer. Por conseguinte, se a lesão ao DNA, promovida pelos agentes carcinogênicos, não for reparada completamente, tal injúria poderá promover mutações no genoma das células, as quais terão a ativação dos oncogenes promotores de crescimento, inativação dos genes supressores de tumor e alterações nos genes que regulam a apoptose. Como consequência, as células cancerosas passam a se comportar de maneira anômala, proliferando-se descontroladamente (KUMAR, *et.al.*, 2008). Ademais, as células cancerosas podem se desprender da massa tumoral primária, migrar através da circulação sanguínea (espalhamento hematogênico) e dos vasos linfáticos, e invadir outros órgãos e tecidos, até mesmo os mais distantes do tumor primário, para o desenvolvimento de implantes secundários (metástases) (WEINBERG, 2008).

O processo de carcinogênese ocorre de forma gradual e pode ser dividido em três estágios até a chegada ao tumor. O primeiro estágio é chamado de iniciação. Nesse estágio, as células normais foram expostas a agentes carcinogênicos, resultando em alterações genéticas e/ou epigenéticas. No estágio seguinte, chamado de promoção, as células que sofreram alterações, como descrito no estágio anterior, transformam-se em células cancerosas. Entretanto, a suspensão do contato com o agente cancerígeno pode interromper o processo de carcinogênese nesse estágio. O terceiro e último estágio, chamado de progressão, apresenta como característica principal a proliferação descontrolada, sendo este um processo irreversível e que evolui até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (ALMEIDA, *et. al.*, 2005).

Na figura 1, além dos aspectos gerais do desenvolvimento do câncer, são apresentadas as principais características dessas células. A proliferação celular descontrolada das células cancerosas dar-se-á por alterações nos mecanismos de controle da produção e liberação dos sinais promotores do crescimento, que atuam no ciclo de replicação celular, fazendo com que as células cancerosas se proliferem de forma desregulada, sendo também insensíveis à ação dos sinais supressores de tumor, atingindo assim um potencial replicativo ilimitado. Subsequentemente, há o processo de invasão tecidual local das células cancerosas por meio de vasos sanguíneos e/ou linfáticos próximos, mas também, as células cancerosas que transitam por esses vasos podem se disseminar para regiões distantes do tumor primário (metástases). Por meio da angiogênese autossustentada para nutrição e eliminação de metabólitos das células do câncer e do desenvolvimento de mecanismos de resistência à morte celular, as células cancerosas tornam-se capazes de se evadirem da apoptose (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

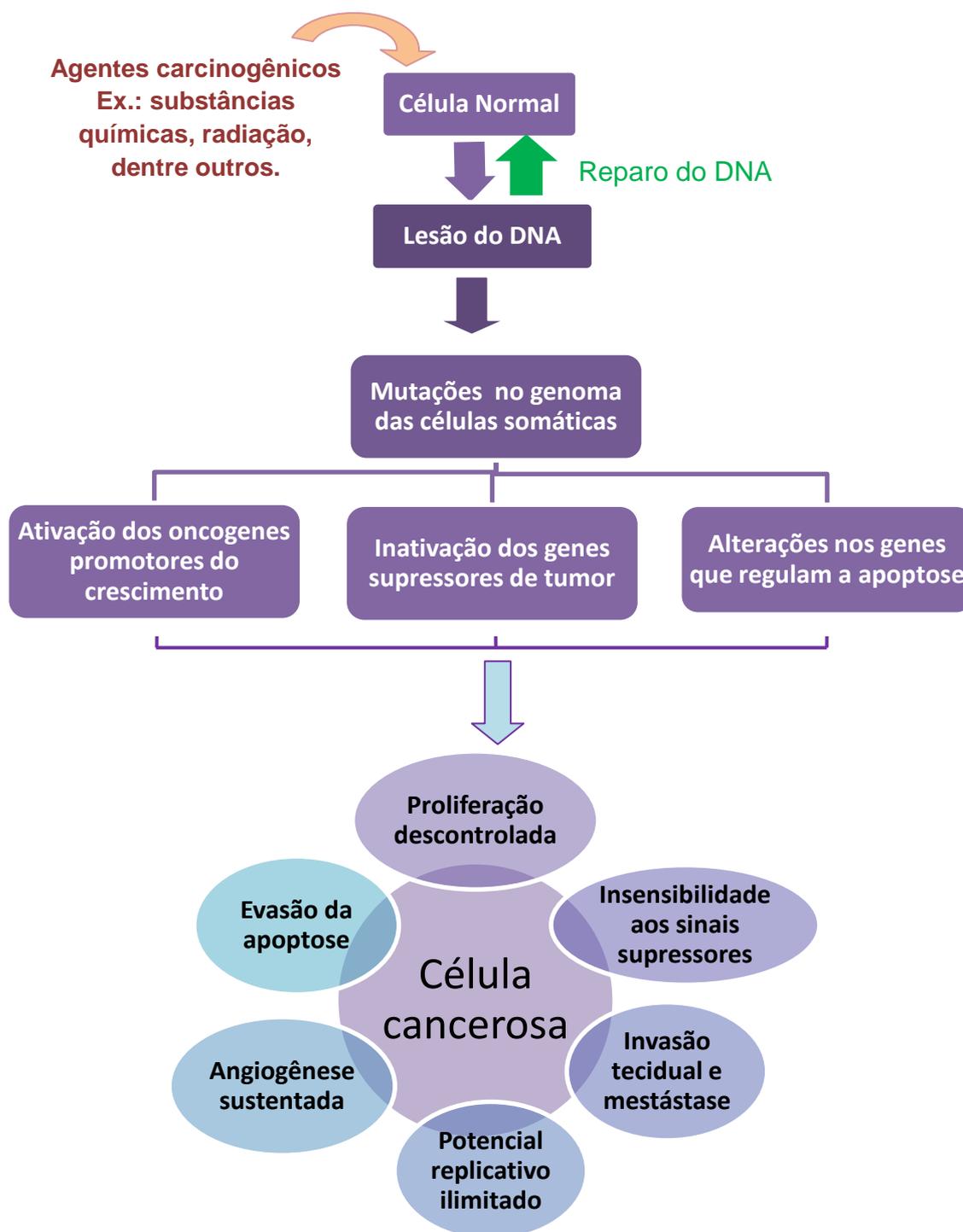


Figura 1: Aspectos gerais do processo de carcinogênese.

Fonte: Adaptado de KUMAR, et. al. (2008) e HANAHAN et. al. (2011).

1.1.2. Perfil Epidemiológico

O número de casos de câncer tem apresentado aumento ao longo dos anos em todo o mundo. Na última década, houve um aumento 20% de acordo com a *World Cancer Research Fund (WCRF)*, configurando-o como um problema de saúde

pública a nível mundial. No Brasil, de acordo com Instituto Nacional de Câncer (INCA), com o passar dos anos vêm ocorrendo uma mudança no perfil epidemiológico, ou seja, mudanças nas causas de mortalidade e morbidade, em consonância com outras transformações demográficas, sociais e econômicas. O câncer é uma das doenças não transmissíveis que contribui para promover alterações no perfil de adoecimento da população brasileira, pois essa se encontra mais exposta a agentes cancerígenos, devido a mudanças no estilo de vida e prolongamento da expectativa de vida. Somado a esses aspectos, há o aprimoramento dos métodos para diagnóstico e aumento no número de óbitos, o que contribui para uma construção estatística mais próxima ao real número de casos de câncer existentes. (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

A estimativa, de acordo com a *World Health Organization* (WHO, 2013), é que em 2030 podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de óbitos por câncer e 75 milhões de pessoas vivas anualmente com a doença. No Brasil, estão previstos 576 mil novos casos para 2014, sendo que em 2008 o câncer representou 14,6% do total de mortes ocorridas no país, configurando-o como a segunda causa de óbito entre os brasileiros, o que reforça a magnitude da gravidade dessa patologia no Brasil. O câncer de pele do tipo não melanoma, com previsão de 182 mil casos novos em 2014, será o de maior incidência na população brasileira, seguidos pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). (MINISTÉRIO DA SAÚDE- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

1.1.3. Câncer de Mama

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de mama é o tipo mais incidente em mulheres a nível mundial, representando a principal causa de óbito do sexo feminino por essa patologia. Em 2012 foram esperados 1,67 milhões de casos novos de câncer de mama em todo o mundo, representando 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados em mulheres, sendo que nesse mesmo ano, câncer de mama foi responsável pelo óbito de 522.000 mulheres (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2013).

No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, provavelmente pelo fato da doença ser diagnosticada em estágios avançados.

Segundo o *Serviço de Informação sobre Mortalidade (SIM)*, no ano de 2011 foram registrados 13.225 óbitos de mulheres por câncer de mama. Em 2014, são esperados 57.120 casos novos de câncer de mama, o que representa 20,8% do total de tipos de câncer que acometerão as mulheres nesse ano (tabela 1).

Tabela 1: Estimativa dos dez tipos de câncer mais incidentes em mulheres, exceto pele não melanoma, no Brasil em 2014.

Localização Primária	Novos Casos	Percentual
Mama feminina	57.120	20,8%
Cólon e Reto	17.530	6,4%
Colo do Útero	15.590	5,7%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Glândula Tireoide	8.050	0,9%
Estômago	7.520	2,7%
Corpo do Útero	5.900	2,2%
Ovário	5.680	2,1%
Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Leucemias	4.320	1,6%

Fonte: Adaptado de Estimativa 2014 - Incidência de câncer no Brasil. INCA/ MS, 2014.

O câncer de mama caracteriza-se por uma proliferação descontrolada das células que compõem os tecidos mamários. A mama é composta basicamente de lóbulos (glândulas produtoras de leite) e ductos (tubos finos que transportam o leite dos lóbulos ao mamilo) – tecido glandular, e estroma (tecido adiposo e conjuntivo, os quais envolvem os lóbulos, ductos, vasos sanguíneos e linfáticos). Esses tecidos são modulados por diversos hormônios, tais como: estrógeno, progesterona, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e prolactina (PRL) (NIH, 2012). Sabe-se que mais de 80% dos cânceres de mama tem origem a partir do epitélio ductal da mama, ao passo que uma minoria se origina do epitélio lobular (MINISTÉRIO DA SAÚDE- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

As células deste tipo de câncer são frequentemente encontradas nos nódulos linfáticos localizados próximos à mama. Entretanto, tais células têm a capacidade de invadir outros órgãos e tecidos (metástases), podendo se espalhar (disseminar) para quase todas as partes do corpo, sendo assim, as regiões mais comuns são: ossos,

fígado, pulmões e cérebro. Os principais sintomas do câncer de mama são: presença de nódulos próximos, ou dentro da mama ou na área das axilas, alterações no tamanho ou formato e na sensibilidade da mama e secreções do mamilo (NIH, 2009).

Apesar de apresentar uma gênese multifatorial, aspectos como: histórico familiar de câncer de mama, fatores hereditários associados à mutações nos genes supressores tumorais BRCA 1 (do inglês Breast Cancer 1), BRCA 2 (do inglês Breast Cancer 2) e o p53; bem como o estado hormonal modulado por função ovariana, como menarca precoce e menopausa tardia, a idade (a taxa incidência aumenta rapidamente até os 50 anos), exposição à radiação ionizante, sedentarismo, além de histórico de câncer prévio, podem estar relacionados ao aumento do risco de desenvolvimento dessa patologia (RUBIN, *et. al.*, 2010).

Há vários tipos de cânceres de mama, os quais podem ser classificados em diferentes subtipos de acordo com o perfil de expressão molecular, tais como: câncer de mama positivo ou negativo para: HER2 (do inglês, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), receptor de progesterona e ou receptor de estrógeno, sendo que aproximadamente 70% dos cânceres de mama são receptor estrógeno positivo (BECERRA, 2013). Assim, o câncer de mama é uma doença heterogênea caracterizada por tipos patológicos distintos, pois, além disso, apresenta diversas mutações genéticas que afetam diferentes vias de sinalização, o que frequentemente resulta em falha ou resistência às terapias (YANG, 2013).

Os métodos mais eficazes de diagnóstico precoce para o câncer de mama são o exame clínico e a mamografia. Quando há diagnóstico e tratamento oportuno, o prognóstico é considerado, geralmente, bom. No entanto, a mortalidade por câncer de mama no Brasil continua elevada provavelmente pelo fato da doença ser diagnosticada nos estágios avançados (MINISTÉRIO DA SAÚDE - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012).

1.2. Tratamento

As principais modalidades de tratamento existentes para o câncer, atualmente, são: cirurgia, radioterapia, bioterapia, quimioterapia e terapia hormonal (figura 2). O tipo de tratamento a ser aplicado irá depender do estadiamento e localização do tumor. No caso do câncer de mama, além dos fatores anteriormente

citados, alguns outros são considerados para a aplicação do tratamento: presença de receptores hormonais no tumor, estado de saúde do paciente e o tamanho do tumor em relação ao tamanho da mama (NIH, 2005).

A cirurgia consiste na remoção física do tumor e é considerada eficaz quando não há presença de metástase (ALMEIDA, *et. al.*, 2005). O tratamento cirúrgico para o câncer de mama se baseia na remoção total ou parcial da mama juntamente com alguns nódulos linfáticos adjacentes. Podem surgir efeitos adversos como suor nas mãos, incômodo e fraqueza no braço adjacente à cirurgia e, devido à mutilação da mama, pode haver diminuição da autoestima (NIH, 2005).

A radioterapia, geralmente utilizada em combinação com a cirurgia, tem a capacidade de reduzir o crescimento do tumor, bem como diminuir a possibilidade de ocorrência de metástase. São utilizados raios gama e radioisótopos, como o cobalto 60 e raios-X, na tentativa de melhorar a eficácia do tratamento, o qual se baseia na sensibilidade do tumor à radiação (ALMEIDA, *et. al.*, 2005). Para o tratamento do câncer de mama geralmente são utilizados dois tipos de radioterapia, que podem ser usadas em conjunto ou separadamente, são elas: radiação externa, em que a radiação é proveniente de um equipamento; e a radiação interna, a qual consiste em implantes (tubos plásticos com substâncias radioativas) que são colocados diretamente na mama. Os efeitos adversos mais comuns para esse tipo de tratamento são: vermelhidão, secura e tendência a inchaço na pele da região tratada (NIH, 2005).

As modalidades terapêuticas acima descritas, caracterizadas como tratamentos locais, representam a cura de um terço dos pacientes, sendo efetivas quando não há ocorrência de metástases, pois se detectada a presença delas, há necessidade de uma abordagem sistêmica, como a quimioterapia (associada com frequência à cirurgia ou radioterapia), a bioterapia ou a terapia hormonal.

A quimioterapia aplicada ao tratamento do câncer consiste na utilização de um ou mais fármacos com o propósito de destruir as células cancerosas (curativa). Todavia, a quimioterapia também pode apresentar outras finalidades a depender do estágio da patologia, são elas: neoadjuvante quando visa à redução física do tumor, adjuvante (profilática) realizada após o tratamento cirúrgico e a paliativa quando se trata de pacientes com a neoplasia disseminada, sendo que nesses casos a finalidade do tratamento se resume na melhora temporária dos sinais e sintomas do câncer (KATSUNG, 2010).

A eliminação das células neoplásicas com a preservação das células normais constitui o objetivo primordial da quimioterapia. No entanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando tanto células cancerosas quanto saudáveis, principalmente as células com crescimento acelerado, por exemplo, as células capilares, gastrointestinais e do sistema imunológico, sendo essa a explicação para a maioria dos efeitos colaterais, como: alterações gastrointestinais (náuseas e vômitos, obstipação ou diarreia, mucosite, xerostomia), alopecia e mielossupressão (ALMEIDA, *et. al.*, 2005). Adicionalmente a esses efeitos, os fármacos utilizados para o tratamento do câncer de mama podem causar parestesias nos pés ou nas mãos, sendo que alguns quimioterápicos podem danificar os ovários, o que pode interromper a produção de hormônios e, possivelmente, causar ondas de calor e secura vaginal, além de infertilidade em alguns casos (NIH, 2005).

A bioterapia fundamenta-se na possibilidade de inibição do crescimento tumoral por meio da mobilização do sistema imune (imunoterapia) do hospedeiro, como interferon α e interleucinas, ou por meio do efeito de agentes biológicos, modulando assim a resposta biológica do organismo (HAO, 2011). Apresenta efeitos adversos diversos, dentre eles destacam-se: febre, dores de cabeça, náuseas e diarreias (NIH, 2005). Porém, apesar de ser uma técnica promissora, a bioterapia é especialmente utilizada para a destruição de células cancerosas residuais após a cirurgia (ALMEIDA, *et. al.*, 2005).

A terapia hormonal ou hormonioterapia baseia-se no fato de que alguns tipos de câncer, tal como o câncer de mama, necessitam de hormônios para crescer. Essa terapia atua diminuindo ou bloqueando a ação dos hormônios importantes, como o estrogênio no câncer de mama, para o desenvolvimento das células tumorais. Os principais fármacos utilizados são inibidores da síntese de estrogênio, moduladores seletivos dos receptores de estrogênio e inibidores (downregulators) seletivos do receptor de estrogênio (BECERRA, 2013). Os efeitos adversos dessa terapia dependem do tipo de fármaco utilizado, mas geralmente incluem náuseas e vômitos, irregularidades no período menstrual, dores de cabeça, ressecamento vaginal e ondas de calor (NIH, 2005).

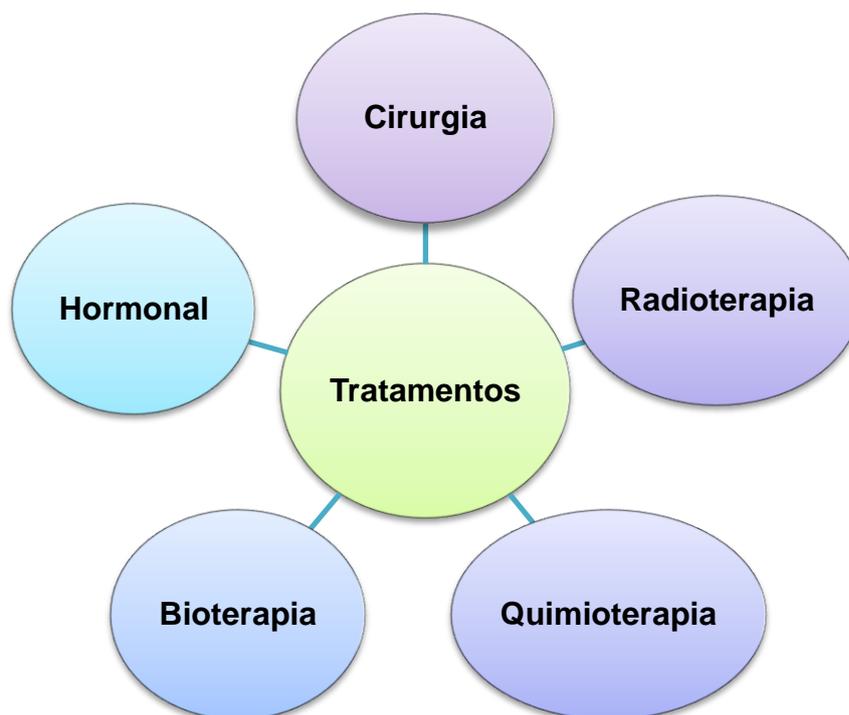


Figura 2: principais modalidades terapêuticas para o tratamento do câncer.

1.2.1. Quimioterápicos antineoplásicos

A maioria dos fármacos antineoplásicos tem seu mecanismo de ação baseado no ciclo celular, visto que o desenvolvimento do câncer está relacionado a alterações nas diferentes fases de replicação das células (MINISTÉRIO DA SAÚDE - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012). Apesar da eficácia terapêutica da maioria dos fármacos antineoplásicos disponíveis ser limitada, resultante de diversos mecanismos de resistência associados a mutações genéticas das células neoplásicas, o conhecimento sobre a cinética do ciclo celular faz-se necessário para melhor entendimento dos mecanismos de ação e até mesmo indicação dos antineoplásicos (KATSUNG, 2010). A figura 3 mostra uma representação esquemática do ciclo celular.

Na fase G0, a célula não está se replicando e seu DNA apresenta baixa atividade nuclear. A preparação da célula para multiplicação, bem como a síntese de constituintes celulares fundamentais para a célula que será gerada, ocorre na fase G1. Na fase S ocorre a síntese do DNA e de diversos mecanismos reguladores da multiplicação celular, os quais estão alterados nas células cancerosas. Na fase G2 há síntese dos componentes necessários à mitose, que se dá na fase M com a produção do fuso mitótico. Subsequente à mitose, há separação entre a célula mãe

e as duas células-filhas recém-formadas, processo denominado citocinese, e então o ciclo de replicação celular é finalizado com o retorno da célula a fase G0. No entanto, quando se trata da célula neoplásica, esta não finaliza o ciclo e vai para a fase G1 (ALMEIDA, *et. al.*, 2005).

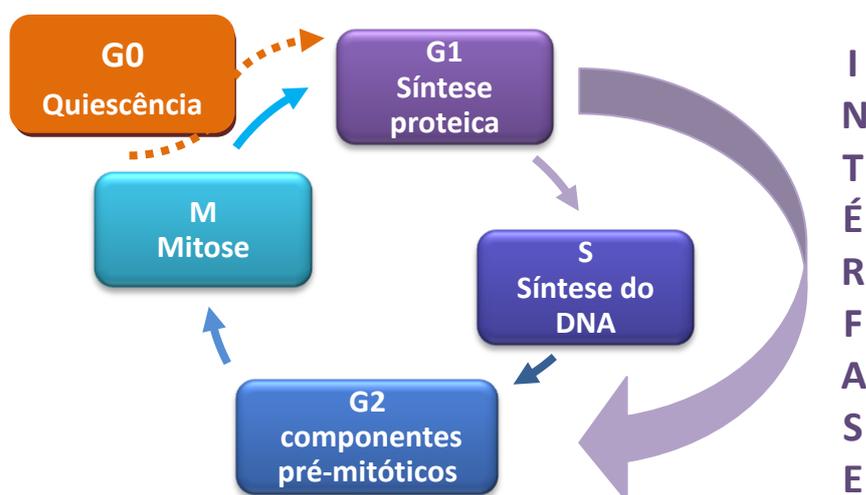


Figura 3: Esquema representativo das fases do ciclo celular.

Fonte: Adaptado de KATSUNG (2010).

Os antineoplásicos que atuam nas células em replicação, ou seja, que estão no ciclo de proliferação celular, são denominados fármacos ciclo- celular específicos. Já os fármacos que tem a capacidade de exercer sua ação sobre a célula, independente de ela estar ou não se proliferando, são denominados fármacos ciclo- celular não específicos. A tabela 2 apresenta a relação entre o ciclo celular e as principais classes de fármacos antineoplásicos. Dentre os agentes hormonais, pertencentes à classe dos fármacos ciclo- específicos, encontra-se o tamoxifeno, utilizado em pacientes com câncer de mama receptor estrógeno positivo e objeto de estudo nesse trabalho.

Tabela 2: As principais classes de fármacos antineoplásicos baseadas no ciclo celular.

Agentes ciclo celular específicos	Agentes ciclo celular não específicos
Agentes antimetabólicos (Ex.: análogo do ácido fólico)	Produtos naturais (Ex.: antibióticos naturais)
Agentes hormonais (Ex.: estrógenos)	Complexos de coordenação de platina (Ex.: cisplatina)
Produtos naturais (Ex.: alcaloides vegetais)	Agentes alquilantes (Ex.: mostardas nitrogenadas)

Fonte: Adaptado de ALMEIDA, *et. al.* (2005).

1.2.2. Tamoxifeno

O tamoxifeno, também conhecido como (Z)-2-[4-(1,2- difenil-1-butenil) fenoxi]-N,N-dimetiletanamina (figura 4) é um fármaco antiestrógeno não- esteroide, possui peso molecular de 371,5 g/mol e forma molecular $C_{26}H_{29}NO$, apresenta-se como pó de coloração branca a branco amarelado. É praticamente insolúvel em água (solubilidade menor que 1% a 20,0°C), mas é solúvel em metanol, etanol, 2-propanol e em propileno glicol (SIGMA ALDRICH, 2014).

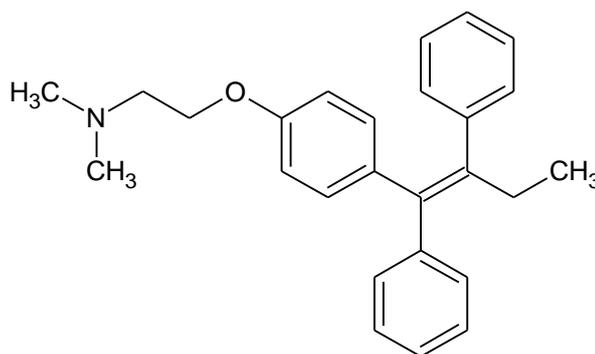


Figura 4: Estrutura química do fármaco tamoxifeno.

A descoberta desse fármaco, conhecido anteriormente como ICI 46.474, ocorreu no início da década de 1960 por meio das pesquisas em busca de fármacos antiestrógenos não- esteroidais realizadas por indústrias farmacêuticas. Estudos com ratos demonstraram que o tamoxifeno era um efetivo contraceptivo pós-coito com possibilidades promissoras para o desenvolvimento da pílula do dia seguinte. Entretanto, devido a diferenças farmacológicas e fisiológicas de ovulação entre

mulheres e ratas, quando testado em pacientes, os estudos clínicos iniciais demonstraram que o tamoxifeno induzia a ovulação em vez de reduzir a fertilidade. Contudo, a descoberta de receptores de estrógenos em alguns tipos de câncer de mama fez com que o papel do estrógeno nesse tipo de câncer fosse melhor compreendido e, então o tamoxifeno começou a ser utilizado em ensaios clínicos para o tratamento do câncer de mama. Seu uso foi aprovado primeiramente no Reino Unido, em 1973, pelo *Committee on the Safety of Medicines in the United Kingdom* e, mais tarde, em 1977 teve a aprovação da *Food and Drug Administration* para ser utilizado nos Estados Unidos (JORDAN, 2006).

Pertencente ao grupo dos compostos trifeniletilênicos, o tamoxifeno apresenta atividades estrogênicas e antiestrogênicas a depender da sua conformação. O isômero Z (trans) da molécula apresenta atividade antiestrogênica e o isômero E (cis) possui atividade estrogênica, sendo comercializado como isômero puro trans (NETO, 2006). O tamoxifeno tem demonstrado ser um fármaco de grande utilidade no tratamento do câncer de mama tanto no estágio inicial quanto no metastático, sendo também aprovado como agente quimiopreventivo em mulheres com alto risco de desenvolver câncer de mama (KATSUNG, 2010). É considerado padrão-ouro para tratamento do câncer de mama, representando um aumento na sobrevida de pacientes livres da patologia e um decréscimo de 50% na recorrência de pacientes com câncer de mama receptor- estrógeno positivo após 15 anos do diagnóstico (LEE, 2008).

1.2.2.1. Mecanismo de ação

O tamoxifeno, primeiro fármaco pertencente à classe dos moduladores seletivos dos receptores de estrógeno, possui mecanismo de ação complexo, sendo utilizado clinicamente como antagonista dos estrógenos, ligando-se aos receptores de estrógenos dos tumores sensíveis a esse hormônio (figura 5) (HELDRING, 2004, KATSUNG, 2010). Para melhor compreensão do seu mecanismo, faz-se necessário o conhecimento sobre ação do estrógeno e seus receptores.

No organismo feminino, o papel fisiológico do estrógeno consiste em induzir respostas específicas na reprodução, no sistema nervoso central, cardiovascular e esquelético. Além disso, regula a proliferação e diferenciação de células saudáveis e neoplásicas da mama (YANG, 2013). A ação do estrógeno em tecidos-alvos é mediada através dos receptores de estrógeno (REs), os quais são membros da

família de receptores nucleares, classificados em dois subtipos: ER α e ER β , sendo que ambos são expressos no tecido mamário e apresentam similaridades em tamanho e estrutura, entretanto apenas o subtipo ER α tem sido associado ao processo de iniciação e progressão do câncer de mama, pois a função do ER β nesse tipo de câncer ainda não está totalmente esclarecida (BECERRA, 2013). A estrutura desses receptores contém duas regiões críticas, o domínio de ligação ao DNA (domínio C) e o domínio de ligação ao ligante (domínio E).

O mecanismo de ação clássico do estrógeno consiste na ligação deste ao domínio E do receptor, o que induz mudança conformacional e dissociação de proteínas que leva à dimerização e translocação do receptor para o núcleo. O complexo ligante- receptor se liga aos elementos de resposta ao estrógeno (EREs), que são sequências únicas de DNA. O domínio C será o sítio onde as interações com os EREs irão acontecer. Após a ligação ao DNA, a função de ativação 1 (AF1) e a função de ativação 2 (AF2) do receptor de estrógeno irão resultar no recrutamento de proteínas co- reguladoras (coativadoras ou coexpressoras), as quais podem aumentar ou suprimir a atividade transcricional do receptor de estrógeno para os genes- alvo dependendo da especificidade do ligante. (BECERRA, 2013). Outros mecanismos indicam que o estrógeno também pode iniciar a transcrição sem os EREs (YANG, 2013).

O tamoxifeno compete com o estrógeno para se ligar aos REs, deslocando assim o estrógeno que nutre o tumor (YANG, 2013). Os efeitos antagonistas desse fármaco estão relacionados à sua capacidade de se ligar ao domínio E do receptor de estrógeno, bloqueando efetivamente a potencial estimulação do estrógeno às células cancerosas. Quando o tamoxifeno se liga ao receptor de estrógeno, esse complexo fármaco-receptor se liga aos EREs dos genes modulados pelo estrógeno, o que promove a ativação somente de AF1 (ativado independente do ligante), resultando na ação de agonista parcial desse fármaco. Portanto, a diminuição da transcrição de genes responsivos ao estrógeno e a ligação de coativadores está relacionada à inativação do AF2 (sua ativação é ligante dependente) nesse contexto. Ademais, o tamoxifeno, ao se ligar com os REs também evita mudanças conformacionais críticas que são necessárias para a associação de coativadores e impede a transcrição dos genes sensíveis ao estrógeno, além de promover um aumento na produção de fator transformador do crescimento β (TGF- β), o qual é um regulador da apoptose e inibe a proliferação das células cancerosas (RIGGINS,

2007). Ele também diminui a produção local do fator de crescimento insulino- símile 1 (IGF-1), minimizando o crescimento das células cancerosas da mama. Mediante a esses mecanismos, o efeito final desse fármaco consiste em diminuir a estimulação autócrina do crescimento do câncer de mama (GOODMAN e GILMAN, 2010). Testes *in vitro* demonstraram que o tamoxifeno provoca a parada do ciclo celular durante a fase G1 em células receptor estrógeno positivo do câncer de mama levando a redução da proliferação celular (YANG, 2013).

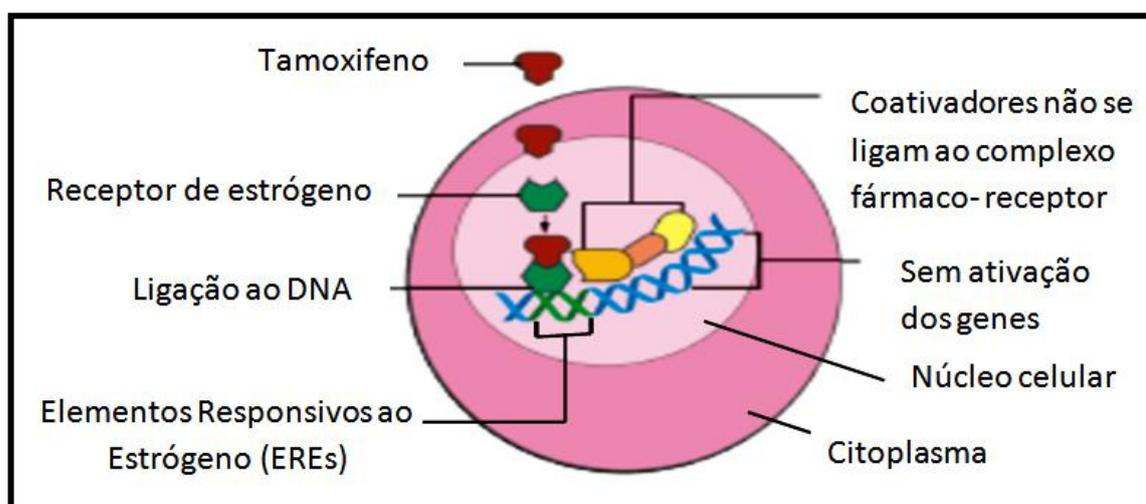


Figura 5: Representação do mecanismo de ação do tamoxifeno nas células da mama. O fármaco se liga ao receptor de estrógeno e, logo após, esse complexo fármaco- receptor liga-se à uma sequência específica (EREs) no DNA. Dessa forma, os coativadores não conseguem se ligar ao complexo fármaco-receptor e, portanto não há ativação dos genes responsáveis pela produção do RNA mensageiro e seus produtos, obtendo como resultado final a inibição da proliferação das células da mama.

Fonte: Adaptado de: NCI- NATIONAL CANCER INSTITUTE (2010).

1.2.2.2. Potenciais efeitos indesejáveis e reações adversas

Por apresentar uma farmacologia tecido-seletiva distinta, o tamoxifeno é agonista em alguns tecidos (ossos, fígado e sistema vascular), antagonista em outros tecidos (mama e cérebro) e uma mistura de agonista/antagonista no útero. Dessa forma, o esperado é que esse fármaco mimetize os benefícios do estrógeno para os ossos e sistema vascular, mas atue como antiestrogênio na mama e no útero, evitando assim os efeitos nocivos do estrógeno nesses tecidos (LEWIS, 2005).

O tratamento com o tamoxifeno é indicado tanto na pré- quanto na pós-menopausa, para tratar todos os estágios do câncer de mama. É usado como tratamento paliativo na doença avançada, como tratamento adjuvante depois de cirurgia para a doença com gânglios negativos ou positivos. O tamoxifeno apresenta-se em comprimidos de 10mg e 20mg (MINISTÉRIO DA SAÚDE-FORMULÁRIO TERAPÊUTICO NACIONAL, 2010). A duração do tratamento é de aproximadamente 5 anos, sendo que esse período de uso tem sido associado ao aparecimento de alguns efeitos indesejados como aumento da incidência de câncer endometrial em pacientes com câncer de mama e pacientes saudáveis que fazem uso da quimioprevenção (LEWIS, 2005). Quando o tamoxifeno é utilizado por um período de 10 anos pode resultar em aumento da recorrência do câncer, bem como aumento no acúmulo de efeitos adversos graves, a exemplo do câncer endometrial e do aparecimento de coágulos no sangue (JORDAN, 2006).

As reações adversas mais comuns atribuídas ao uso do tamoxifeno são: ondas de calor, náuseas e vômitos. Também podem ocorrer irregularidades menstruais, sangramentos e corrimentos vaginais, prurido vulvar e dermatite, a depender do estado menopáusico da paciente. Estudos demonstraram que esse fármaco provoca hepatotoxicidade em animais, apesar de não se ter relatos de aumento na incidência de carcinoma hepatocelular primário em pacientes que fazem uso do fármaco. O tamoxifeno causa depósitos nas retinas, diminuição da acuidade visual e cataratas em algumas pacientes, contudo a frequência dessas ocorrências ainda não está bem estabelecida (GOODMAN e GILMAN, 2010).

O uso prolongado do tamoxifeno tem sido associado ao desenvolvimento de mecanismos de resistência a esse fármaco. Estudos indicam que o tratamento prolongado altera a sua farmacologia, passando de um antiestrógeno para estimulador do crescimento. Há 3 tipos de mecanismos de resistência ao tamoxifeno: resistência metabólica, resistência intrínseca e resistência adquirida (JORDAN, 2007).

A ativação metabólica do tamoxifeno ocorre via desmetilação do N- desmetil-tamoxifeno e subsequente transformação para o metabólito hidroxí-endoxifeno, sendo esse processo essencial para que o fármaco atinja sua máxima atividade antiestrogênica e antitumoral. Estudos laboratoriais demonstraram que o endoxifeno é formado pelo sistema enzimático CYP2D6. No entanto, existem grandes variações, que podem ser desde subtipos variantes com a atividade reduzida a

subtipos com atividade nula dessa enzima na população, que podem influenciar no metabolismo do fármaco e, conseqüentemente reduzir sua eficácia. Outro aspecto a ser considerado diz respeito ao controle dos sintomas da menopausa, principalmente as intensas ondas de calor, relacionadas ao efeito antiestrógeno do fármaco. Os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) têm sido utilizados para tratar as ondas de calor, porém os ISRS são inibidores potentes da enzima CYP2D6, o que pode interferir na eficácia do tratamento com tamoxifeno (JORDAN, 2007).

A resistência intrínseca ao tamoxifeno está relacionada à proporção de receptores de estrógeno no tumor, sendo que o câncer metastásico que possui tanto receptores de estrógeno quanto de progesterona apresenta maiores respostas à terapia hormonal do que o câncer que possui somente receptores de estrógeno. Sabe-se também que o aumento na sinalização do fator de crescimento via EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) prejudica a indução estrogênica de progesterona em células do câncer de mama e aumenta a estimulação parácrina do fator de crescimento, o que compromete a efetividade do tratamento antiestrógeno no receptor de estrógeno (JORDAN, 2007).

A resistência adquirida pode se desenvolver quando tumores que inicialmente respondem ao tratamento com tamoxifeno aumentam os níveis do receptor de fator de crescimento que ativa a cascata de fosforilação e assim, o tamoxifeno estimula no tumor um aumento nuclear nos níveis de fator nuclear $\kappa\beta$ resultando no crescimento das células cancerosas da mama (JORDAN, 2007).

1.3. Considerações sobre Nanotecnologia

Nanotecnologia constitui uma ciência que envolve desenho, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos que podem ser manipulados a nível molecular e atômico. As bases conceituais dessa ciência tiveram início em 1959 quando o físico Richard Feynman explorou a possibilidade de manipulação de materiais em escala subatômica. No entanto, o termo “nanotecnologia” foi utilizado pela primeira vez somente em 1974 em uma publicação científica de Norio Taniguchi, um pesquisador da Universidade de Tóquio (SAHOO, 2007).

Por se apresentar como uma ciência multidisciplinar, a nanotecnologia envolve a aplicação de sistemas físicos, químicos e biológicos em tamanhos que

variam de átomos individuais ou moléculas a dimensões submicrométricas (VENDITTO e JR, 2013). Desse modo, o principal objetivo da nanotecnologia é explorar as propriedades estruturais dos materiais e sistemas em escala nanométrica, visto que essas estruturas apresentam novos comportamentos ou modificações físicas, químicas e/ou biológicas devido à sua escala. Essa tecnologia envolve uma gama de materiais como polímeros, metais e biomateriais estruturados em escala nanométrica que originam nanopartículas, nanotubos e nanofibras.

Uma das aplicações da nanotecnologia denomina-se nanomedicina, a qual pode ser definida como o monitoramento, reparo, construção e controle de sistemas biológicos humanos no contexto molecular através de nanodispositivos e nanoestruturas. Além disso, a nanomedicina também está relacionada às propriedades de distribuição e desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos e outros agentes terapêuticos (SAHOO, 2007).

1.3.1. Sistemas de Liberação de Fármacos

A chegada do fármaco ao seu local de ação e a manutenção da dose nesse sítio estão entre os principais obstáculos para o sucesso no tratamento de diversas patologias. A maioria dos fármacos possui uma faixa de concentração que estabelece os níveis de segurança e eficácia. Concentrações abaixo ou acima dessa faixa podem causar ineficiência do tratamento, além de graves efeitos tóxicos ou sintomas anteriormente não evidenciados (FIGUEIREDO, *et. al.*, 2008). A aplicação convencional dos fármacos é caracterizada por uma efetividade limitada, biodistribuição deficiente e falta de seletividade. Essas limitações e desvantagens podem ser minimizadas ou superadas através dos sistemas de liberação de fármacos (*DDS- Drug Delivery Systems*), que podem apresentar liberação controlada/sustentada (*controlled release system* ou *sustained release system*) (WILCZEWSKA, *et. al.*, 2012).

O sistema de liberação controlada/sustentada de fármacos pode ser definido como um sistema de administração desenvolvido para prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, sustentar sua concentração plasmática e controlar a localização temporal e espacial das moléculas *in vivo* por meio da aplicação de princípios biológicos e químicos (VILLANOVA, *et. al.*, 2010). A liberação controlada consiste em liberação pontual do fármaco que pode ser acionada por um dispositivo, apresentando como vantagens o aumento da atividade

terapêutica e a redução de efeitos adversos e, assim reduz o número de doses do fármaco requerido durante o tratamento. A liberação sustentada do fármaco consiste em liberação que se mantém constante ao longo do tempo, o que possibilita a manutenção do efeito terapêutico por um longo período (VILAR, *et. al.*, 2012).

Os mais variáveis dispositivos que são empregados como DDS podem ser classificados de acordo com a distribuição do composto ativo em sistemas reservatórios ou em sistemas matriciais. Em sistemas reservatórios como as microcápsulas (figura 6a), as substâncias ativas encontram-se aprisionadas no interior de uma barreira de difusão inerte ou adsorvidas à parede da matriz polimérica. Já em sistemas matriciais como as microesferas poliméricas (figura 6b), em que as substâncias são dispersas em um polímero inerte, ou seja, constituem uma mistura homogênea das substâncias na matriz polimérica, de modo que os ativos podem estar adsorvidos à superfície e no interior da esfera (FIGUEIREDO, *et. al.*, 2008).

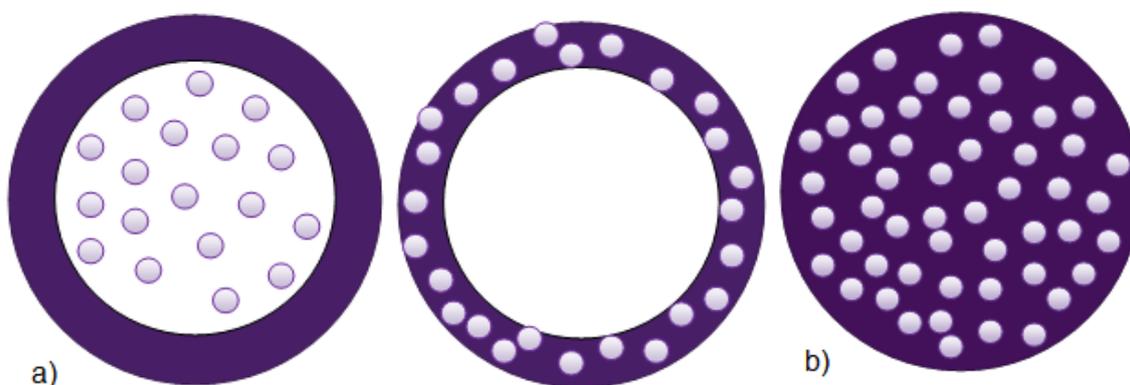


Figura 6: Representação esquemática de microcápsulas (a) e microesferas (b).

As nanopartículas, como sistemas de liberação de fármacos, são partículas que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . As partículas que possuem diâmetro de 1 μm a 1000 μm são denominadas micropartículas e podem ser produzidas a partir de polímeros naturais ou sintéticos. As micropartículas têm sido consideradas sistemas de liberação promissores na pesquisa científica por serem capazes de liberar o fármaco de forma sustentada em diversos locais do organismo (CAMPOS, *et. al.*, 2013).

O primeiro uso de micropartículas como sistema de liberação sustentada na indústria farmacêutica foi patenteado em 1970 por W.M. Holliday e colaboradores. O

sistema criado, administrado via oral, consistia em ácido acetilsalicílico encapsulado no interior de uma fina camada contínua composta de etilcelulose. Essa nova composição farmacêutica possibilitou uma liberação gradual do ácido acetilsalicílico para a corrente sanguínea através do mecanismo de difusão por um período de 4 horas após a administração oral, resultando em 8 horas de efeito analgésico. Além disso, o sistema de liberação microestruturado também foi utilizado como estratégia para reduzir o efeito irritante do ácido acetilsalicílico na mucosa gástrica, reduzir a frequência de administração e melhorar a adesão do paciente. Dessa forma, desde 1970 o desenvolvimento de micropartículas como sistema de liberação de compostos terapêuticos vem se destacando e tem representado um avanço tecnológico promissor (CAMPOS, *et. al.*, 2013, GILL, *et. al.*, 2007).

O sistema de liberação microestruturado de fármacos oferece proteção ao agente terapêutico encapsulado contra reações de degradação (oxidação, calor, desidratação, ácidos e bases) no ambiente externo, resultando no aumento da vida de prateleira do medicamento; possibilita a estruturação de substâncias que normalmente são difíceis de administrar devido à fatores como insolubilidade do material, volatilidade e higroscopicidade; oferece proteção ao trato gastrointestinal quando o fármaco, administrado via oral, oferecer risco de irritar a mucosa (DUCHESNEAU, 2013); promove o aumento da atividade farmacológica e reduz os efeitos adversos (SAHIL, *et. al.*, 2011). Ademais, oferece maior eficiência terapêutica quando comparado aos medicamentos convencionais, libera uma alta concentração do agente terapêutico no local desejado, há redução da dosagem administrada em micropartículas, aumento da especificidade e do tempo de meia vida do fármaco (GILL, *et. al.*, 2007).

A liberação sustentada e prolongada do fármaco, oferecida pelos sistemas de liberação, permitem evitar sub ou superdosagens, pois mantém a concentração do fármaco constante por um período prolongado de tempo dentro da faixa terapêutica através de uma única dosagem. Em contrapartida, nos sistemas de liberação convencionais há flutuações da concentração do agente terapêutico, o que pode resultar em sub ou superdosagem, em que a concentração do fármaco atinge um ponto máximo e então decresce, dificultando a obtenção do estado de equilíbrio (*steady-state*), ponto em que a taxa de eliminação do fármaco é igual à taxa de biodisponibilidade. Portanto, a obtenção de uma concentração constante de fármaco no sangue torna-se complexa. Além do mais, as flutuações nos níveis de fármaco

propiciam a precipitação de efeitos adversos (RATILAL, *et. al.*, 2011). Diante disso, o desenvolvimento de sistemas de liberação que sejam capazes de controlar a concentração do agente terapêutico de forma a mantê-la dentro da faixa terapêutica faz-se de grande importância terapêutica, pois promove um aumento na eficácia e redução da toxicidade (VILLOS, VELASQUES, 2012).

Para a indústria farmacêutica, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos representa uma grande vantagem frente ao processo de criação de novos fármacos, pois as novas tecnologias de liberação possibilitam a reutilização de fármacos clássicos, através de alterações nos parâmetros farmacocinéticos, os quais promovem melhora na biodisponibilidade e biodistribuição. Consequentemente, são uma alternativa considerável frente ao desenvolvimento de novos fármacos, que é um processo oneroso e demanda longos períodos de pesquisa. Como exemplo do crescimento desse tipo de mercado, aproximadamente 13% do mercado farmacêutico mundial está relacionado com produtos que possuem um sistema de liberação de fármacos (SAHOO, *et. al.*, 2007).

A liberação do fármaco a partir das micropartículas poliméricas surge como uma consequência da degradação e/ou erosão do dispositivo polimérico. Portanto, o conhecimento sobre a natureza química dos polímeros é essencial para entender o mecanismo de liberação. Nos casos em que a degradação da matriz polimérica ocorre, a substância ativa difunde-se através dos canais gerados pela quebra das cadeias de polímero, sem a perda de volume da partícula. Por outro lado, quando o veículo polimérico sofre erosão, em conjunto com a perda de massa do polímero, o ativo é liberado. Neste caso, há uma diminuição do volume de matriz polimérica de acordo com a liberação do agente terapêutico. Estudos mostraram que as altas temperaturas e condições de baixo pH favorecem a degradação de polímeros com um aumento subsequente da taxa de liberação de fármaco encapsulado em micropartículas poliméricas (VILLOS e VELASQUES, 2012).

A biodistribuição das micropartículas envolve mecanismo passivo e/ou ativo. O transporte passivo, ao explorar as características biológicas tumorais, possibilita o acúmulo dos nano/microcarreadores no tumor por meio do efeito permeabilidade e retenções aumentadas (*Enhanced permeability and retention*, efeito EPR). O mecanismo ativo caracteriza-se por conjugar substâncias ativas à superfície de nano/microcarreadores contendo moléculas que se ligam a receptores ou antígenos superexpressos na superfície do tumor (PEER, *et. al.*, 2007).

Os polímeros são uma classe de materiais bastante versáteis, pois possuem diversas aplicações e funcionalidades, especialmente em sistemas de liberação de fármacos. A escolha do polímero é substancial para o desenvolvimento de microcarreadores, uma vez que o polímero deve apresentar compatibilidade físico-química com a substância a ser encapsulada e com a via de administração escolhida. Dentre os materiais utilizados, há destaque para os polímeros sintéticos não biodegradáveis, como o Eudragit RL 100®, utilizado neste trabalho, encontrados em diversas composições que possibilitam o fácil ajuste das propriedades e podem promover o maior controle da liberação do fármaco (OLIVEIRA, LIMA, 2006).

1.3.2. Eudragit RL 100®

As micropartículas baseadas em polímeros sintéticos são opções para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada/sustentada de fármacos, pois é possível fazer uma preparação de polímeros sintéticos de forma controlada/sustentada, resultando na produção de materiais com composição e peso moleculares bem estabelecidos, além de ser possível o conhecimento de propriedades como solubilidade e degradabilidade (SAJJA, *et. al.*, 2009). Os polímeros sintéticos geralmente possuem uma estrutura bem definida que é responsável por um controle mais preciso sobre a cinética de degradação (HAMIDI, *et. al.*, 2008).

Eudragit, uma classe de polímeros sintéticos, é uma marca registrada da Rohm GmbH & Co. KG. Darmstadt na Alemanha, de polimetacrilatos, comercializado pela primeira vez em na década de 1950. Há diversas variações de polímeros de Eudragit que podem ser classificados em poli metacrilatos solúveis e em poli metacrilatos insolúveis. Os poli metacrilatos solúveis (Eudragit L, S e FS) se solubilizam nos fluidos digestórios formando um sal e são utilizados para mascarar sabores desagradáveis de fármacos, além de controlar a liberação de agentes terapêuticos em todas as regiões do intestino. Já os poli metacrilatos insolúveis (Eudragit RL 100 e RS), não se solubilizam, mas são permeáveis aos fluidos biológicos e permitem uma liberação controlada pelo tempo das substâncias ativas através da sua capacidade de intumescimento independente do pH, sendo também utilizado para liberação sustentada de fármacos (JOSHI, 2013).

Dentre os poli metacrilatos insolúveis, evidencia-se o Eudragit RL 100, criado em 1968 (figura 7), um co-polímero catiônico biocompatível de poli (etilacrilato, metil-

metacrilato e cloro trimetil-etil- amônio metacrilato) contendo grupos de amônio quaternário presentes como sais que tornam o copolímero permeável e insolúvel em água com pH fisiológico (EVONIK INDUSTRIES, 2011), sendo essas qualidades que possibilitam a dispersão dos princípios ativos encapsulados.

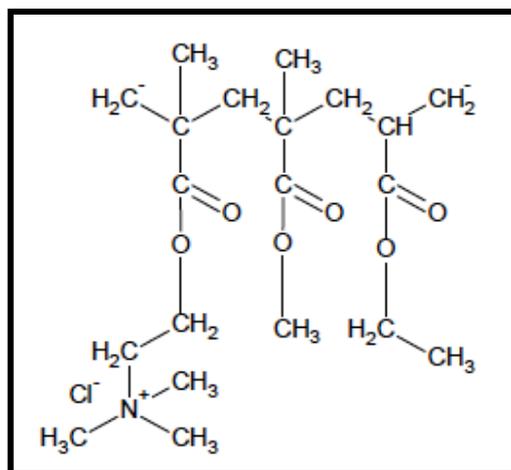


Figura 7: Estrutura química do Eudragit RL 100.

Fonte: Adaptado de EVONIK INDUSTRIES (2011).

O Eudragit RL 100 é um material bioadesivo, de modo que essa propriedade é explorada como estratégia para aumentar o tempo de permanência do agente terapêutico no organismo, o que melhora a biodisponibilidade do fármaco e reduz o número de doses administradas (VILLANOVA, *et. al.*, 2010). É um polímero não biodegradável que pode proporcionar uma barreira de difusão para pequenas e grandes moléculas de fármacos, qualidade apreciável para a liberação controlada/sustentada de fármacos (SHASTRI, 2003). É bastante utilizado como agente de liberação controlada, possui peso molecular médio de aproximadamente 32.000 g/mol, apresenta-se em forma de grânulos incolor ou levemente branco com suave odor característico da amina. É solúvel principalmente em metanol, etanol e acetona (SONJE, *et. al.*, 2013). Esse polímero tem sido utilizado em estudos para formulações orais para liberação sustentada de fármacos (BASU, ADHIYAMAN, 2008) e também para sistemas de liberação de fármaco via ocular (DAS, *et. al.*, 2010).

1.3.3. Nanotecnologia aplicada ao tratamento do câncer

A cada ano surgem mais de 10 milhões de novos casos de câncer, sendo essa doença considerada uma das mais devastadoras do mundo. No entanto, a mortalidade tem sido diminuída nos últimos anos devido à melhora na compreensão da biologia do tumor e ao aprimoramento de dispositivos para diagnóstico e tratamentos. Nesse sentido, os primeiros ensaios clínicos com nanocarreadores começaram em meados da década de 1980 e os primeiros produtos baseados em lipossomas e conjugados polímero- proteínas foram comercializados a partir da década de 1990. Essa nova abordagem terapêutica surgiu como tentativa de direcionar seletivamente os agentes terapêuticos às células cancerosas, pois apesar dos avanços, a terapêutica tradicional ainda induz a morte de células saudáveis (PEER, *et. al.*, 2007).

O avanço das pesquisas em nanotecnologia aplicada em sistemas nanocarreadores tem se mostrado bastante promissor. Atualmente, o mercado farmacêutico dispõe desses sistemas nanoestruturados para o tratamento de vários tipos de tumores, além de outras patologias. Entre os principais sistemas usados estão os lipossomas, imunocjugados e conjugados polímero proteína.

O uso de lipossomas para encapsular a doxorubicina – Doxil® (utilizada no tratamento de câncer de ovário metastático, mieloma, dentre outros) foi o primeiro nano- fármaco aprovado pelo FDA em 1995 e tem sido utilizado na clínica desde então (BARENHOLZ, 2012). Além da doxorubicina, o uso de lipossomas para encapsular o paclitaxel, conhecido como Lupusu®, foi aprovado para ser comercializado pelo FDA da China em 2003 para o tratamento de câncer de ovário e de pulmão (YE, *et. al.*, 2013), e a vincristina, conhecida como Marqibo®, teve aprovação do FDA em 2012 para ser utilizada no tratamento de leucemia linfoblástica aguda em pacientes com cromossomo Filadélfia negativo (SILVERMAN e DEITCHER, 2013). O quimioterápico caliqueamicina conjugado a um anticorpo anti-CD33 (comercializado como Mylotarg®) foi aprovado em 2000 para o tratamento da leucemia mieloide aguda, sendo, no entanto, banido do mercado (PEER, *et. al.*, 2007).

Entre as formulações que possuem nanopartículas poliméricas, Abraxane®, consiste em paclitaxel encapsulado em nanopartículas de albumina e é a única disponível no mercado (MIELE, *et. al.*, 2009). As micelas poliméricas, nanopartículas fármaco- polímero conjugados e nanopartículas lipídio- fármaco conjugados

constituem outras formulações nanoestruturadas em ensaios clínicos (EGUSQUIAGUIRRE, *et. al.*, 2012). Formulações como cisplatina lipossomal para o tratamento de câncer de pulmão (Lipoplatin®), doxorubicina termosensível (TermoDox®) para carcinoma hepatocelular primário estão em ensaio clínico fase III (ALLEN, CULLIS, 2013). Diante disso, os nanocarreadores podem ser considerados agentes promissores na pesquisa por novos tratamentos para diversos tipos de câncer.

Além dos nanocarreadores para o tratamento do câncer, há também pesquisas para desenvolvimento de sistemas nanoestruturados como ferramenta terapêutica para diversas patologias, sendo que vários produtos têm sido aprovados para uso clínico. Dentre os produtos que já estão no mercado, pode-se citar: anfotericina B lipossomal (Abelcet®) para o tratamento de infecções fúngicas, a morfina lipossomal (DepoDur®) utilizada pós-cirurgia para promover uma analgesia dose-sustentada, sistemas poliméricos para o tratamento da esclerose múltipla (Copaxone®), hepatite B e C (Pegasys®) e também vacinas que utilizam lipossomas em sua formulação, como as contra hepatite A (Epaxal®) e contra influenza (Inflexal® V) (ZHANG, 2008).

A pesquisa por sistemas de liberação de fármacos tem demonstrado que os nanocarreadores apresentam vantagens como, a seletividade pelo seu sítio de ação e, conseqüentemente, pode haver redução dos efeitos adversos relatados nas terapias convencionais. Em contrapartida, verifica-se que, apesar de ter várias pesquisas no campo da nanotecnologia aplicada a DDS's, apenas um número mínimo de sistemas são aprovados e chegam ao mercado para o tratamento do câncer. Dessa forma, faz-se necessário o aprimoramento no conhecimento dos alvos farmacológicos atrelados à biologia do câncer, bem como o desenvolvimento de formulações seguras, eficazes e físico-quimicamente estáveis.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de ser conhecido há séculos, o câncer tem afetado a saúde da população a nível mundial e, atualmente, é considerado um problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde estima que no ano de 2030 haja 27 milhões de casos incidentes dessa patologia. No Brasil, as estimativas feitas para o ano de 2014 apontam a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de

câncer. Para o sexo feminino, o câncer de mama é o segundo tipo mais incidente, com uma previsão de 57 mil novos casos em 2014, o que representa 20,8% do total de tipos de câncer que acometerão as mulheres nesse ano. Nesse contexto, a taxa de mortalidade por câncer de mama no Brasil continua elevada provavelmente pelo fato da doença ser diagnosticada em estágios avançados. Dados do *Serviço de Informação sobre Mortalidade (SIM)* mostram que em 2011 foram registrados 13.225 óbitos de mulheres por câncer de mama (MINISTÉRIO DA SAÚDE- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

Atualmente, as terapias antineoplásicas existentes apresentam-se ineficientes, pois geralmente as células cancerosas desenvolvem mecanismos de resistência aos agentes quimioterápicos, os quais por não serem seletivos podem induzir o aparecimento de diversos efeitos adversos graves e até mesmo tóxicos. Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de novas formas de terapias antineoplásicas, de forma que elas atuem especificamente sobre as células tumorais, reduzindo assim os danos às células saudáveis e os efeitos adversos. Devem possuir liberação sustentada por um maior período de tempo que os medicamentos atuais, possibilitando a redução do número de dosagens e aumentando a biodisponibilidade do fármaco encapsulado, sendo essa uma propriedade atribuída ao sistema de liberação controlada/sustentada.

O tamoxifeno está entre os fármacos mais utilizados no tratamento do câncer de mama e tem demonstrado ser um fármaco de grande utilidade tanto no estágio inicial quanto estágio no metastásico da doença, também aprovado como agente quimiopreventivo em mulheres com alto risco de desenvolver câncer de mama (KATSUNG, 2010). Portanto, é proposto o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada/sustentada de tamoxifeno visando aumentar a biodisponibilidade e minimizar os efeitos adversos, de forma a melhorar a terapêutica com esse fármaco.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar micropartículas de Eudragit RL 100 contendo tamoxifeno como agente antitumoral.

3.2. Objetivos específicos

- Produzir micropartículas de Eudragit RL 100 por meio de adaptação do método de evaporação do solvente;
- Caracterizar parâmetros físico- químicos como distribuição de diâmetro hidrodinâmico, potencial ζ e eficiência de encapsulamento;
- Avaliar a estabilidade das micropartículas através da distribuição de diâmetro hidrodinâmico e potencial ζ em função do tempo;
- Determinar o perfil de liberação do tamoxifeno encapsulado em função do tempo;
- Avaliar o fármaco encapsulado e livre espectroscopicamente em solução orgânica na região UV- visível (UV/Vis) e infravermelho (IR);
- Avaliar a viabilidade celular em linhagem de células tumorais MCF-7 tratadas com as micropartículas de Eudragit RL 100 contendo tamoxifeno.

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais

4.1.1. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho, descritos na tabela 3, possuíam grau analítico e foram utilizados sem purificação prévia.

Tabela 3: Descrição dos reagentes utilizados com seus respectivos fabricantes.

Reagentes	Fabricante
Acetona	Dinâmica Química Contemporânea, BR
Antibacterianos (estreptomicina e penicilina)	Gibco, EUA
Azul de tripan	Sigma- Aldrich
Cloreto de cálcio	Vetec Química Fina, BR
Cloreto de potássio	Vetec Química Fina, BR
Cloreto de sódio	Vetec Química Fina, BR
D-MEM (<i>Dulbecco's Modied Eagle's Medium</i>)	Gibco, EUA

Eudragit RL® 100	Evonik industries
Fosfato de potássio monobásico	Vetec Química Fina, BR
Fosfato de sódio bibásico dihidratado	Vetec Química Fina, BR
Metanol	Synth, BR
Monoestearato de sorbitano (Span® 60)	Sigma- Aldrich, USA
Soro fetal bovino	Gibco, EUA
Tamoxifeno	Sigma- Aldrich, EUA
Tripsina- EDTA	Sigma- Aldrich, EUA

4.1.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Descrição dos equipamentos utilizados com seus respectivos fabricantes.

Equipamentos	Fabricante
Agitador de tubos tipo vortex (modelo LSM56III)	IKA
Câmara de Neubauer	C.A. Hausser & Son, EUA
Chapa de agitação magnética e aquecimento (modelo LS61-220)	Logen Scientific
Centrífuga de microtubos, modelo Mikro 220R	Hettich Lab Technology, USA
Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier, modelo IRPrestige-21	Shimadzu, JAP
Espectrofotômetro para microplacas, modelo M2	SpectraMax®
Espectrofotômetro UV-Vis, modelo U-3900H	Hitach, JAP
Homogeneizador Ultra-turrax, modelo T25	IKA, CH
Micropipetas automáticas com escalas	Capp, DEN

de 2-20 μL , 20-200 μL e 100-1000 μL

(modelo Ecopipete)

Microscópio óptico de luz invertido, Olympus, JAP

modelo CK2

Zetasizer Nano ZS Series, modelo ZEM Malvern Instruments Limited, UK

3600

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação das Micropartículas

As micropartículas de Eudragit RL 100 foram produzidas através de uma adaptação do método de evaporação do solvente (ANSARI, *et. al.*, 2012).

Primeiramente, foi preparada uma solução de Eudragit RL® 100 (12,5% p/v) em acetona e metanol na proporção de 3:1. Em seguida, 20 mL dessa solução foram dispersos em uma solução contendo acetona e surfactante, Span® 60 (1%), utilizando o homogeneizador Ultra-turrax® a 10.000 rpm. Para micropartículas carregadas com tamoxifeno, 10 mg do fármaco são adicionadas à solução de Eudragit RL® 100. Então, a solução resultante é agitada magneticamente para a evaporação parcial dos solventes e redução do seu volume para, aproximadamente, 20 mL. Em seguida, as partículas são centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 20,0 °C, lavadas três vezes e suspensas em água (figura 8).

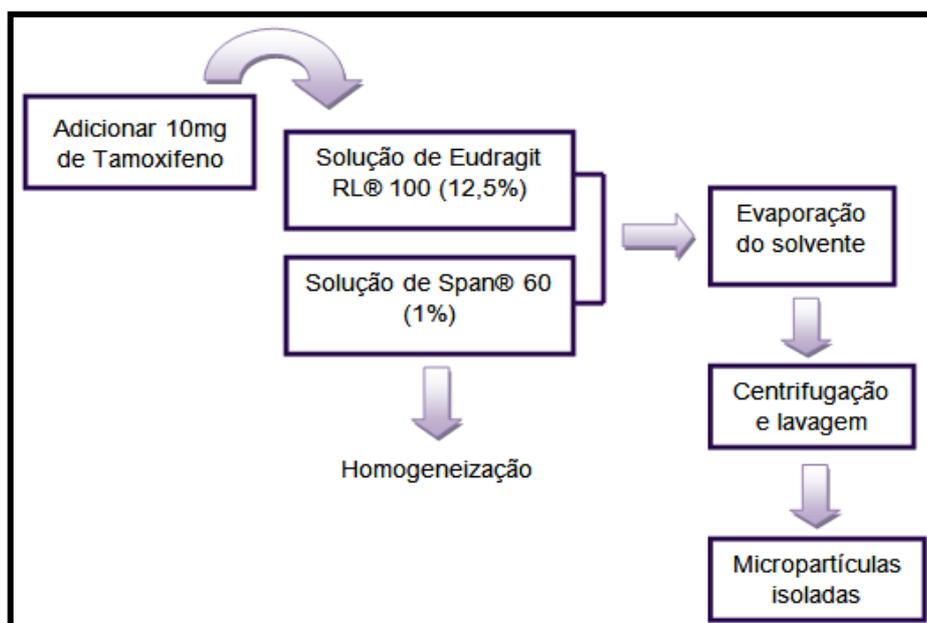


Figura 8: Esquema de preparo das micropartículas de Eudragit RL 100 contendo tamoxifeno.

4.2.2. Preparação da solução tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline, PBS*)

Para o preparo de 50 mL da solução tampão fosfato salino, pH 7,2, foram utilizados 4,0000g de cloreto de sódio, 0,1000g de cloreto de cálcio, 0,5800g de fosfato de sódio bibásico e 0,1000g de fosfato de potássio monobásico. Esse compostos foram solubilizados em água ultrapura sob agitação constante.

4.2.3. Avaliação da distribuição de diâmetro hidrodinâmico e potencial ζ

A distribuição de diâmetro hidrodinâmico das micropartículas e o potencial ζ foram analisados através do equipamento Zetasizer Nano ZS Series (modelo ZEM 3600, Malvern Instruments) em que as medições foram realizadas a 25,0 °C e a um ângulo de 90,0 °C.

A análise da distribuição de diâmetro hidrodinâmico é realizada através da técnica de espalhamento dinâmico da luz (*Dynamic Light Scattering, DLS*). Assim, um feixe de luz é irradiado à suspensão de micropartículas e promove o movimento destas na suspensão, movimento Browniano, sendo a velocidade dessa movimentação utilizada para calcular o diâmetro hidrodinâmico das partículas, incluindo a camada de solvatação que as circunda. As partículas maiores se movimentam mais lentamente do que as partículas menores (MALVERN INSTRUMENTS, 2004).

O potencial ζ é determinado por meio da mobilidade eletroforética das partículas. Para essa análise, a suspensão de micropartículas é transferida para uma cubeta eletroforética e aplicado um potencial. Dessa forma, as partículas se movimentam em direção ao eletrodo de carga oposta e, então, mede-se a velocidade de movimentação das partículas, que é expressa em unidade de voltagem (MALVERN INSTRUMENTS, 2004).

As amostras utilizadas para análise da distribuição de diâmetro hidrodinâmico médio e potencial ζ foram diluídas em água na proporção de 1: 30 v/v. Os dados foram obtidos por meio do software Zetasizer 6.20 e transferidos para o programa de construção de gráficos GraphPad Prism 5.0.

4.2.4. Avaliação da eficiência de encapsulamento

A avaliação da eficiência de encapsulamento (EE%) tem por finalidade determinar a porcentagem de fármaco incorporada ao sistema de liberação

desenvolvido. Essa análise foi realizada por meio da técnica de espectrofotometria, em que foi avaliada a razão entre a quantidade de fármaco encapsulado e a quantidade inicial de fármaco utilizada na preparação das micropartículas (equação 1).

$$EE\% = \left(\frac{\text{Quantidade de fármaco encapsulada}}{\text{Quantidade inicial de fármaco}} \right) \times 100\%$$

Equação 1: Cálculo da porcentagem da eficiência de encapsulamento.

A quantificação de fármaco presente no interior da partícula se deu por espectrofotometria UV/Vis através do método direto, em que as partículas sofreram desintegração da sua matriz polimérica, com a utilização do solvente metanol, e posterior liberação do fármaco que compôs a amostra a ser analisada.

Para o cálculo da concentração do fármaco encapsulado utilizou-se a equação da reta (equação 2), a qual foi obtida através da curva de calibração do tamoxifeno em metanol (figura 9). A curva de calibração foi construída a partir de 13 pontos da solução orgânica de tamoxifeno, sendo que a concentração do fármaco variou de 0,001 a 0,009 mols/L, no comprimento de onda de 277 nm. O índice de correlação (r^2) obtido foi 0,9972, que representa linearidade dos pontos da reta. Os dados foram tratados com o software UV Solutions 3.0 e transferidos para o programa de construção gráfica GraphPad Prism 5.0.

$$\text{Concentração (mols/L)} = \frac{\text{Absorbância} + 0,0605}{13203}$$

Equação 2: Cálculo para determinação da concentração de tamoxifeno encapsulado.

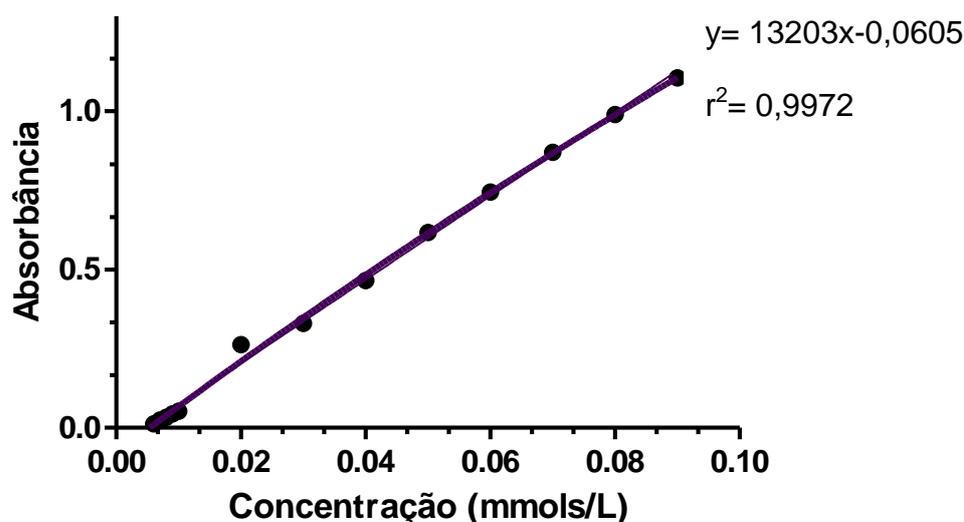


Figura 9: Curva de calibração do tamoxifeno em metanol.

4.2.5. Avaliação do perfil de liberação do fármaco

A determinação do perfil de liberação visa avaliar a cinética de liberação do fármaco da matriz polimérica em função do tempo. Para as análises de doseamento do fármaco foi utilizada a técnica de espectrofotometria UV/Vis, logo após a preparação das micropartículas, durante as cinco primeiras horas e depois, a cada 24 horas durante quatorze dias.

Utilizou-se tampão fosfato salino (PBS pH 7,2) para avaliar a cinética de liberação, *in vitro*, do tamoxifeno da matriz polimérica. As amostras foram mantidas em banho termostatizado, sob a temperatura de 37,0 °C, para simulação *in vitro* da temperatura fisiológica humana.

As análises espectrofotométricas foram realizadas em horários pré-determinados. Após a síntese das micropartículas contendo tamoxifeno, retirou-se 1,00 mL da suspensão, o qual foi transferido para outro tubo, centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e colocado em banho termostatizado. Assim, no horário indicado, a amostra era retirada do banho, centrifugada, transferia-se 500 µL do sobrenadante para outro tubo, o qual foi colocado no dessecador para a secagem da amostra e adicionava-se 500 µL de solução tampão à amostra inicial que voltava para o banho termostatizado. Após a eliminação da fração líquida da amostra a ser analisada, esta era ressuspensa em metanol e analisada através de métodos espectrofotométricos. As amostras foram avaliadas durante 336 horas (14 dias). Os

dados foram obtidos através do software UV Solutions 3.0 e transferidos para o programa GraphPad Prism 5.0.

4.2.6. Avaliação espectroscópica na região UV/Vis

Os espectros de absorção do fármaco em estudo, tamoxifeno, encapsulado no sistema de liberação proposto, livre em solução e das micropartículas vazias, tem por finalidade identificar e avaliar o comportamento da matriz polimérica e do fármaco nas micropartículas.

A obtenção dos espectros de absorção se deu através do uso do espectrofotômetro UV/Vis (ultravioleta visível) Hitachi U3900-H, de cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Antes de dar início às análises, a linha de base (cubetas contendo o meio em estudo sem os cromóforos) foi obtida. Em seguida, foram realizadas as análises das respectivas amostras que continham: o fármaco em meio orgânico e em suspensão de micropartículas, e uma amostra de micropartículas vazias em suspensão. Os espectros foram obtidos na faixa espectral de 200 a 800 nm. Os dados foram tratados com o software UV Solutions 3.0 e transferidos para o programa de construção de gráficos GraphPad Prism 5.0.

4.2.7. Avaliação espectroscópica na região do infravermelho

A obtenção dos espectros de infravermelho se deu através do espectrofotômetro de transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*, FT-IR). Foram analisadas amostras do tamoxifeno livre, micropartículas contendo tamoxifeno e do polímero Eudragit RL® 100 isolado. A preparação das amostras, precedente às análises, consistiu em produzir pastilhas de brometo de potássio (KBr), as quais foram prensadas a 80,0 kN por 3 minutos. Para a realização das leituras no equipamento, as amostras foram secas em dessecador e adicionadas ao KBr para que as pastilhas fossem formadas. A varredura estava compreendida na região 4.000 a 400 cm^{-1} em número de ondas. A obtenção dos dados se deu por meio do software IR Solution 1.50, sendo então transferidos para o programa de construção gráfica GraphPad Prism 5.0.

4.2.8. Avaliação do perfil de estabilidade

A determinação do perfil de estabilidade visa avaliar a estabilidade das micropartículas em relação ao diâmetro hidrodinâmico e potencial ζ em função do

tempo (288 horas). A análise das amostras, que foram mantidas em banho termostaticado a 37,0 °C, foi realizada a cada 24h utilizando o equipamento da marca Malvern Instruments, Zetasizer Nano ZS Series, modelo ZEM 3600. Os dados foram tratados com o software Zetasizer 6.20 e transferidos para o programa de construção de gráficos GraphPad Prism 5.0.

4.2.9. Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular com a linhagem MCF-7 foi realizado no Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília, laboratório de Nanobiotecnologia, sob orientação e supervisão da prof^a Dr^a Graziella Anselmo Joanitti.

A linhagem MCF-7 corresponde a células de câncer de mama humano derivada de efusão pleural retirada de uma paciente com câncer de mama em 1970. Essa linhagem celular tem se mostrado de grande utilidade para estudos *in vitro* do câncer de mama por manter várias características intrínsecas do epitélio mamário. Além disso, as células MCF-7 são responsivas ao estrógeno por apresentarem receptores desse hormônio no citoplasma (ZHENG, *et. al.*, 2007).

A avaliação da viabilidade celular fundamentou-se através do teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Esse composto quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória e gera baixos valores de absorvância (espectrofotometria) na ausência de células (PERES, *et. al.*, 2008). Para cada tipo de célula, a relação linear entre o número de células e o sinal produzido é estabelecida, permitindo assim uma quantificação exata das alterações na taxa de viabilidade celular quando incubadas com micropartículas vazias, o fármaco encapsulado e o fármaco livre em solução, permitindo assim a diferenciação das células não viáveis.

4.2.9.1. Cultivo celular

O cultivo das células foi realizado em uma garrafa de 75 cm³ contendo o meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (D-MEM), soro fetal bovino a 10% e solução antimicrobiana de penicilina e estreptomicina a 1%

Como as células apresentam a característica de crescerem aderidas na superfície da garrafa, formando uma monocamada, foi necessário utilizar uma solução de tripsina- EDTA, a qual cliva, por meio de reações enzimáticas, as ligações proteicas formadas entre a parede da garrafa, a matriz extracelular, e as células. Assim, foram adicionados 4,00 mL dessa solução à garrafa, a qual ficou na estufa a 37,0 °C durante 3 minutos para otimizar a ação da tripsina. Logo após, foi verificado, com auxílio de um microscópio, se as células se desprenderam da parede da garrafa e, em seguida, adicionou-se 4,00 mL de D-MEM para neutralizar a ação da tripsina. Então, as células foram transferidas para tubos e centrifugadas a 1000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuscitado com 1,00 mL de meio de cultura.

4.2.9.2. Contagem de células

A determinação da densidade celular foi realizada utilizando 10 µL da suspensão de células que foram adicionados em 90 µL de solução azul de tripan 0,4% (m/v em PBS). Para a contagem das células, utilizou-se a câmara de Neubauer, em que foram contadas as células que estavam nos quatro quadrantes laterais e o valor foi utilizado na equação 3 para a determinação da densidade celular.

Densidade celular (células/ mL)

$$= \frac{\text{Número de células}}{\text{Número de quadrantes (4)}} \times \text{Fator de diluição (10)} \times 10^4$$

Equação 3: Equação para determinar a densidade celular.

A densidade celular que deveria conter em cada poço, para o cultivo das células em uma placa de 96 poços, era de $5,0 \times 10^3$ células por poço e, dessa forma, a quantidade necessária de suspensão para atingir esse valor foi calculada. Logo em seguida, as células foram recultivadas e incubadas em estufa a 37,0 °C a CO₂ 5% *overnight*.

4.2.9.3. Tratamento das células

Decorrido o período *overnight*, foi feita a análise da morfologia das células contidas na placa de cultivo, a fim de verificar se as mesmas encontravam-se viáveis para o prosseguimento do estudo.

As células foram organizadas em quatro grupos para a avaliação da viabilidade celular, de acordo com o tratamento utilizado: controle (M1), micropartículas contendo tamoxifeno (M2), micropartículas vazias (M3) e tamoxifeno livre em solução de etanol 1% (M4).

O preparo das soluções de micropartículas contendo tamoxifeno, micropartículas vazias e solução de tamoxifeno livre ocorreram através de diluições em meio D- MEM suplementado. Sendo assim, retirou-se o meio de cultivo da placa e os tratamentos foram adicionados (200 μ L/poço). As análises foram realizadas em triplicata e em 4 diluições (1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 v/v). Logo após o plaqueamento e tratamento da linhagem celular, a placa de cultivo foi incubada em estufa a 37,0 °C com CO₂ 5% por 24 horas.

Após o período de incubação, o meio de cultura contendo os tratamentos mencionados anteriormente foram removidos cuidadosamente e adicionou-se 15,0 μ L da solução de MTT e 135,0 μ L de meio de cultura fresco. Em seguida, as placas foram inseridas na estufa de CO₂ por 3 horas. Após esse período, o meio de cultura que continha o MTT foi removido e foi adicionado 150,0 μ L de DMSO à cultura celular. A solução presente na placa de células foi homogeneizada para que os cristais de formazan formados fossem totalmente solubilizados em DMSO. Através de um leitor de microplacas (SpectraMax® modelo M2), foi feita a identificação espectroscópica do formazan na região do comprimento de onda de 570 nm e, assim determinada a viabilidade das células de MCF-7.

A análise estatística dos resultados se deu por meio da ANOVA seguida de Pós-teste de Bonferroni.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da distribuição de diâmetro hidrodinâmico e potencial ζ

5.1.1. Micropartículas vazias

A análise das micropartículas vazias apresentou como resultado da distribuição de diâmetro hidrodinâmico um valor médio de 1,69 \pm 0,6 μ m (figura 10).

A determinação do diâmetro hidrodinâmico se deu através do método DLS de intensidade de espalhamento da luz pelas micropartículas. Dessa forma, devido à relação direta entre a dispersão da luz e o diâmetro das partículas, pode-se dizer que as partículas com diâmetros maiores promovem maior dispersão de luz que as partículas com diâmetros menores.

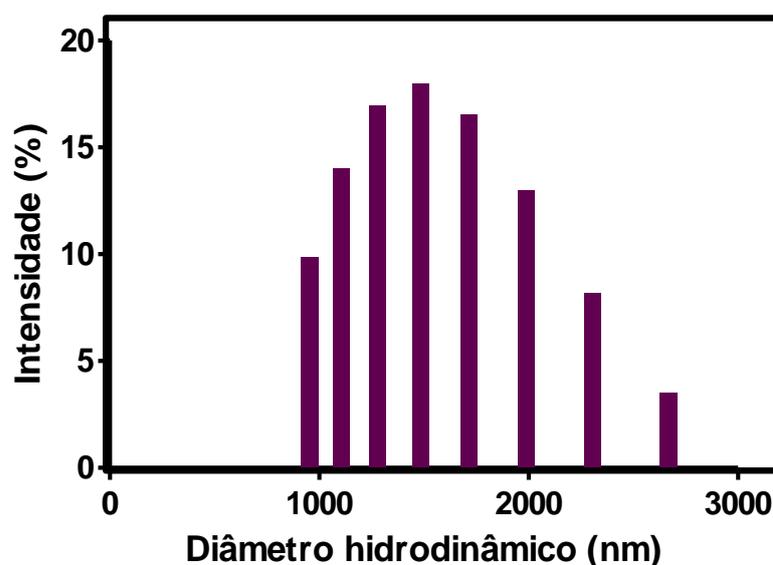


Figura 10: Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das micropartículas de Eudragit RL 100 vazias.

O potencial ζ , que representa uma medida da magnitude da repulsão ou atração eletrostática entre as cargas da superfície das partículas em meio líquido, apresentou um valor de +63,1 mV (figura 11). Esse resultado reflete as cargas positivas intrínsecas do Eudragit RL®, um polímero policatiônico.

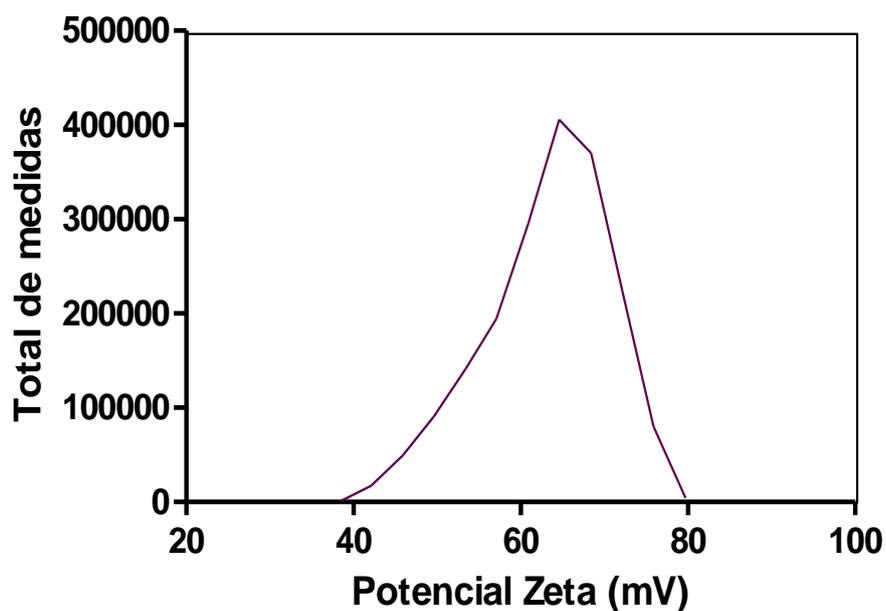


Figura 11: Potencial ζ das micropartículas vazias de Eudragit RL 100.

5.1.2. Micropartículas contendo tamoxifeno

A análise do diâmetro hidrodinâmico médio resultou em partículas com $2,03 \pm 0,4 \mu\text{m}$ (figura 12).

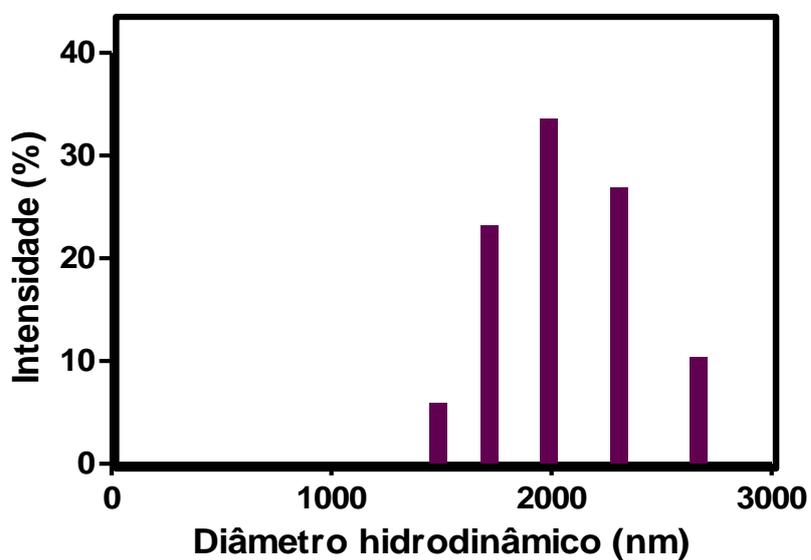


Figura 12: Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das micropartículas de Eudragit RL 100 contendo tamoxifeno.

O potencial ζ , parâmetro que reflete o potencial de superfície das partículas, resultou em $+58,8 \text{ mV}$ (figura 13). Foi observada uma pequena mudança de carga

na superfície da partícula, o que pode ser atribuído à adição do fármaco ao sistema microparticulado.

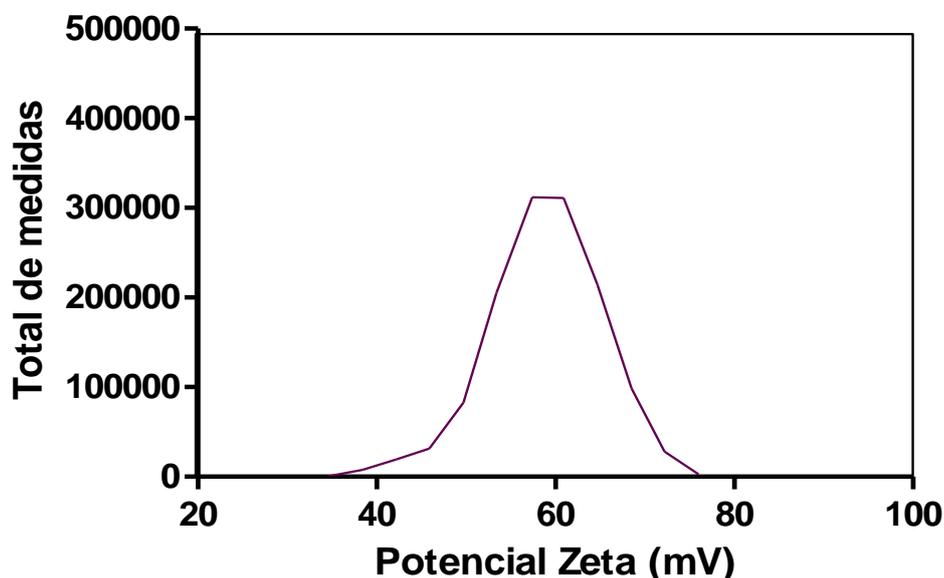


Figura 13: Potencial ζ de micropartículas de Eudragit RL® 100 contendo tamoxifeno.

A tabela abaixo sumariza as principais características do sistema microparticulado no que diz respeito à distribuição do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial ζ .

Tabela 5: Apresentação dos dados referentes à distribuição de diâmetro hidrodinâmico, Índice de polidispersividade (Pdl) e potencial ζ das micropartículas de Eudragit RL 100.

Micropartículas	Tamanho (μm)	Pdl	Potencial ζ (mV)
EDGT RL 100 vazias	$1,69 \pm 0,6$	0,714	+63,1
EDGT RL 100- TMX	$2,03 \pm 0,4$	0,387	+58,8

5.2. Avaliação da eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento do sistema de liberação microestruturado, o qual foi sintetizado predominantemente através de adaptação no método de evaporação do solvente, foi de 27% em relação a 10 mg de tamoxifeno utilizado na síntese das micropartículas. O resultado foi obtido a partir da equação 1, com base na análise de espectrofotometria UV/Vis.

5.3. Avaliação da cinética de liberação do fármaco

As micropartículas contendo tamoxifeno apresentaram uma cinética de liberação *in vitro* caracterizada por duas diferentes fases (bifásica). O primeiro estágio consiste em uma rápida liberação inicial do fármaco, seguido de um aumento lento e gradual de liberação, característico do segundo estágio.

Foi observado que nas primeiras 24 horas houve uma liberação acelerada do fármaco encapsulado, o que corresponde à liberação de aproximadamente 54,22% do fármaco. Após esse período, foi verificada uma liberação lenta que sofreu aumento de forma paulatina até o décimo quarto dia, totalizando 86,8% de fármaco liberado (figura 14). A quantidade de fármaco restante foi liberada a partir da degradação do polímero ao longo do tempo, o que não foi registrado no gráfico.

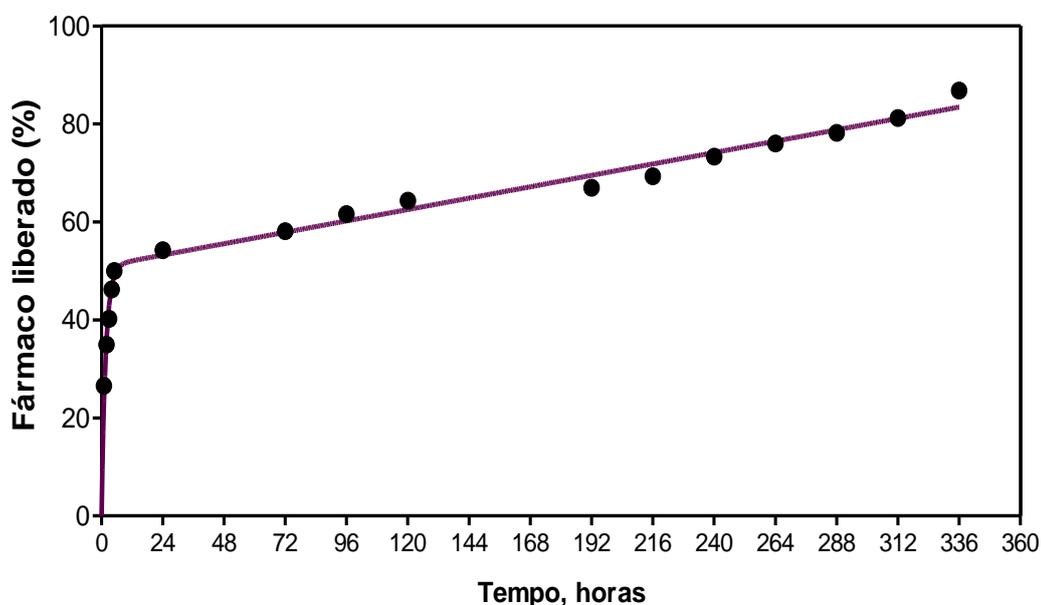


Figura 14: Perfil de liberação do tamoxifeno microencapsulado em polímeros de Eudragit RL 100 durante 336 horas a 37,0 °C.

5.4. Avaliação espectroscópica na região UV/vis

As análises espectroscópicas na região do UV/vis foram realizadas a fim de caracterizar o comportamento do polímero e do fármaco separadamente, em solução orgânica, das micropartículas vazias e das micropartículas contendo tamoxifeno. Foi verificado que o Eudragit RL® 100 apresentou um espectro com pico de absorção de luz na região de 213 nm (figura 15).

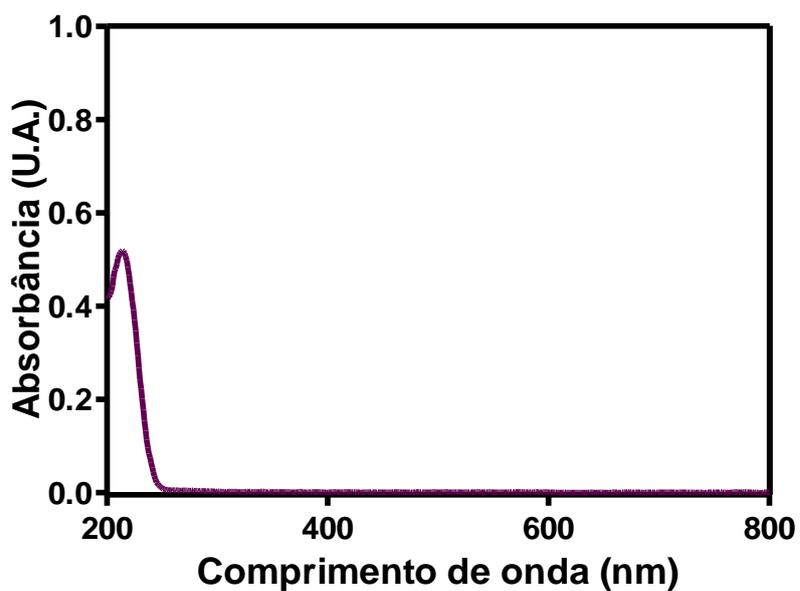


Figura 15: Espectro de absorção do polímero Eudragit RL 100 em metanol.

As micropartículas vazias analisadas espectroscopicamente apresentaram uma ampla faixa de absorção, que compreende a região entre 200 e 800 nm, e pode ser visualizada na figura 16.

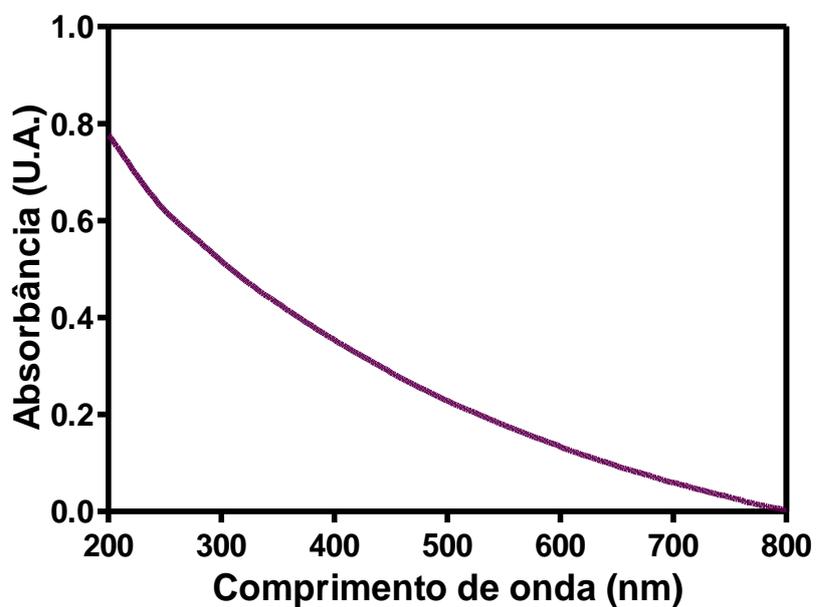


Figura 16: Espectro de absorção de micropartículas vazias de Eudragit RL 100 em solução aquosa.

O tamoxifeno livre em solução orgânica apresentou um espectro contendo dois picos máximos de absorção em 240 nm e 277 nm, de acordo com o observado na figura 17.

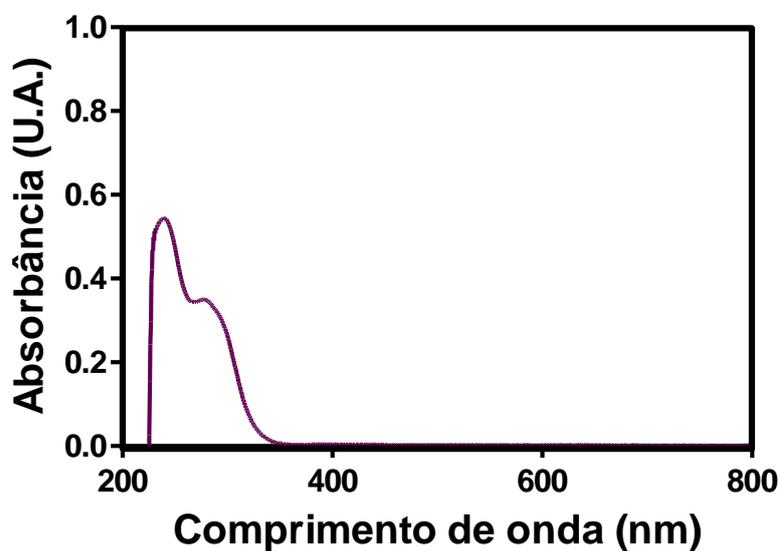


Figura 17: Espectro de absorção do tamoxifeno livre em solução orgânica de metanol.

As análises das micropartículas contendo tamoxifeno apresentaram um espectro de absorção similar ao das micropartículas vazias, com espalhamento de luz na região entre 200 e 800 nm, conforme visualizado na figura 18.

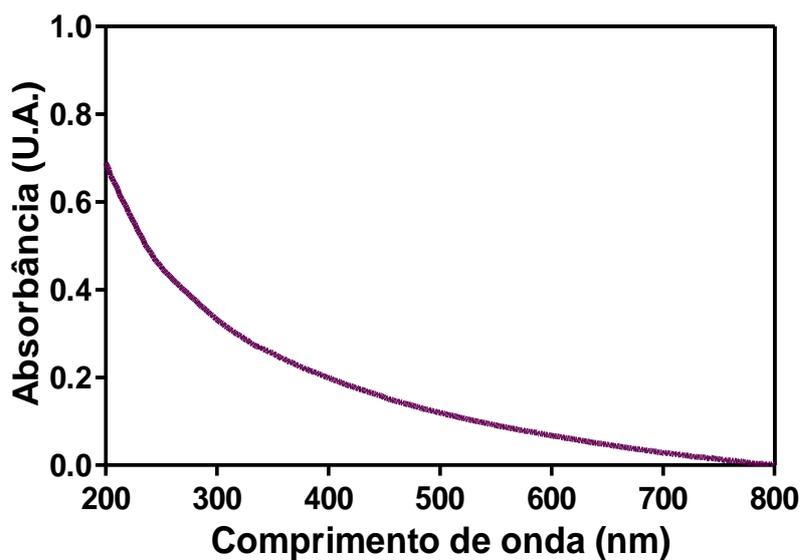


Figura 18: Espectro de absorção de micropartículas contendo tamoxifeno em solução aquosa.

A figura a seguir diz respeito ao espectro de absorção das micropartículas contendo tamoxifeno em metanol, o que demonstra ser possível a determinação da eficiência de encapsulamento do sistema proposto por espectroscopia UV/Vis, uma vez que foi escolhido o pico em 277 nm para minimizar a interferência da alta intensidade de espalhamento de luz do Eudragit RL 100 (figura 15) na região próxima ao outro pico característico do tamoxifeno (240 nm).

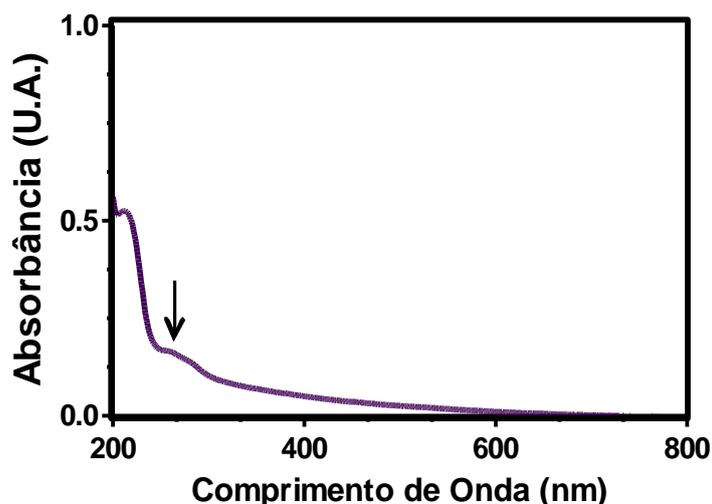


Figura 19: Espectro de absorção das MPs-TMX em metanol. A seta indica o pico (277 nm) considerado para o cálculo da eficiência de encapsulamento do tamoxifeno.

5.5. Avaliação espectroscópica na região do infravermelho

Na figura 20 estão representados os espectros de FTIR para as micropartículas contendo tamoxifeno, o tamoxifeno livre e polímero Eudragit RL® 100. A tabela 6 lista os principais picos identificados nas amostras, bem como as interações moleculares.

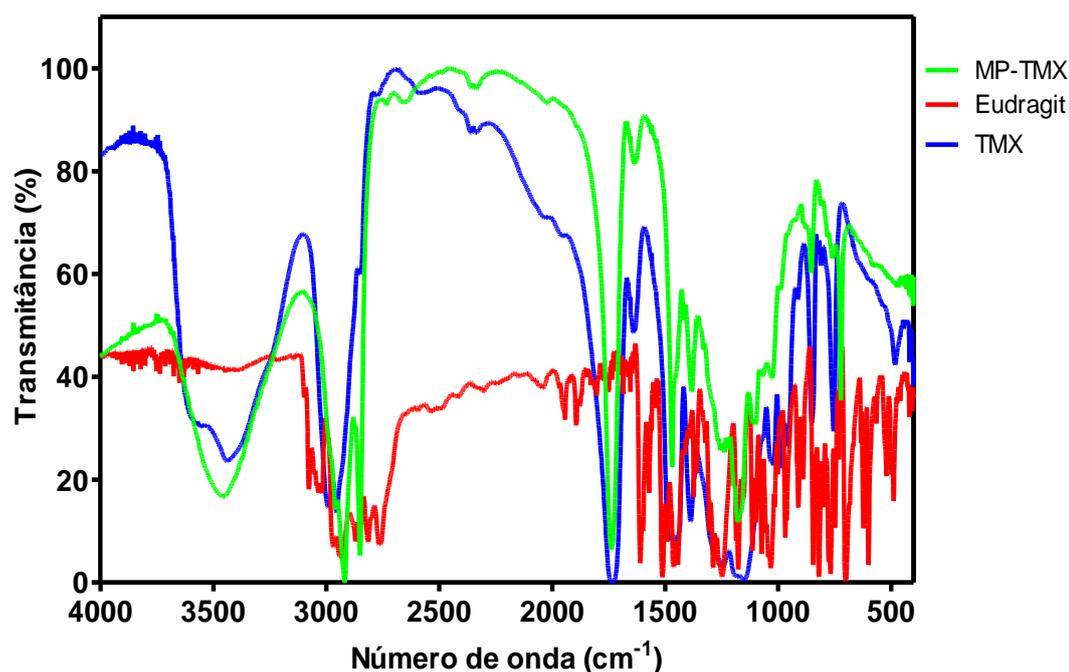


Figura 20: Espectro de FTIR das MPs-TMX, TMX e EDGT.

Tabela 6: Bandas de absorção em FTIR de MPs-TMX, TMX livre e EDGT e suas respectivas interações.

Pico (cm ⁻¹)	Espectro			Interação
	MPs-TMX	TMX livre	EDGT	
2950-3000	X	X		Estiramento =C - H
1730	X	X	X	Estiramento C = O
1475	X	X		Estiramento do anel C = C
1450	X	X		Estiramento do anel C = C
1380			X	Estiramento C - H
1240- 1260	X	X		Estiramento RCOOR'

Ao analisar as interações supracitadas, foi verificado que as micropartículas contendo tamoxifeno possuem picos nos mesmos números de onda que o fármaco

livre, o que confirma de forma qualitativa a presença do agente terapêutico no interior da matriz polimérica.

5.6. Avaliação do perfil de estabilidade

A análise do perfil de estabilidade do sistema microparticulado se deu com base nos parâmetros de distribuição do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta, com a finalidade de determinar o comportamento das micropartículas em função do tempo.

As mudanças no diâmetro hidrodinâmico das micropartículas de Eudragit RL® 100 contendo tamoxifeno estão representadas na figura abaixo. Foi observado um comportamento variável do diâmetro das micropartículas ao longo de 12 dias de análise, de modo que do primeiro ao terceiro dia houve uma redução no diâmetro, seguido de um aumento que perdurou até o quinto dia. Do quinto ao oitavo dia foi verificado um leve aumento de diâmetro, ao passo que do oitavo ao décimo segundo houve uma queda acentuada do diâmetro das partículas.

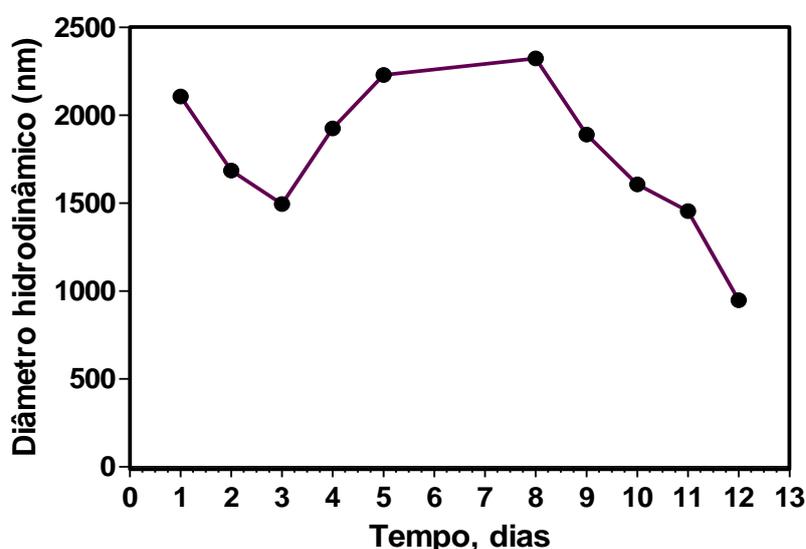


Figura 21: Perfil de estabilidade. Variação da distribuição de diâmetro hidrodinâmico das micropartículas de Eudragit RL 100 contendo tamoxifeno a 37,0 °C durante 12 dias.

A figura 22 retrata o perfil de estabilidade das micropartículas em relação ao potencial ζ que, inicialmente era de +58,8 mV. Observou-se que durante os três primeiros dias de análise, houve uma pequena variação no valor de potencial ζ , seguido por uma redução acentuada desse valor no quarto dia, o que se relaciona à redução e aumento brusco do diâmetro das partículas do terceiro para o quarto dia,

representado na figura 21. Uma leve redução no potencial ζ foi verificada do quinto ao oitavo dia, o qual foi seguido de uma redução gradual até o décimo dia, sendo que do décimo ao décimo segundo dia houve pequenas alterações no comportamento do potencial ζ .

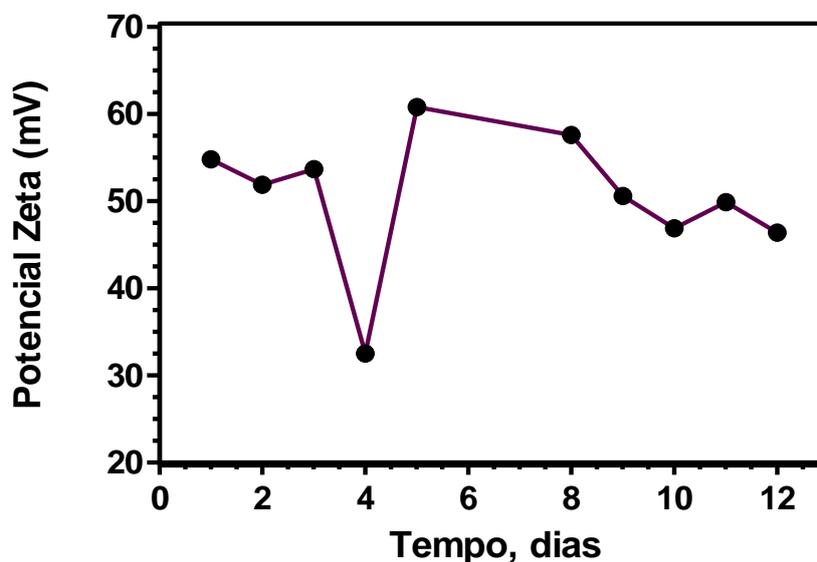


Figura 22: Perfil de estabilidade. Variação do potencial ζ das micropartículas de Eudragit RL 100 contendo tamoxifeno a 37,0 °C durante 12 dias.

5.7. Análise de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando células da linhagem MCF-7, as quais foram tratadas com as concentrações de 0,2238 mols/L, 0,4474 mols/L, 0,8950 mols/L e 1,7900 mols/L de micropartículas vazias, micropartículas contendo tamoxifeno e tamoxifeno livre a fim de estabelecer uma comparação entre os tratamentos. A viabilidade celular foi analisada após 24 horas de incubação das células com os tratamentos supracitados. Os resultados estão dispostos na figura 23.

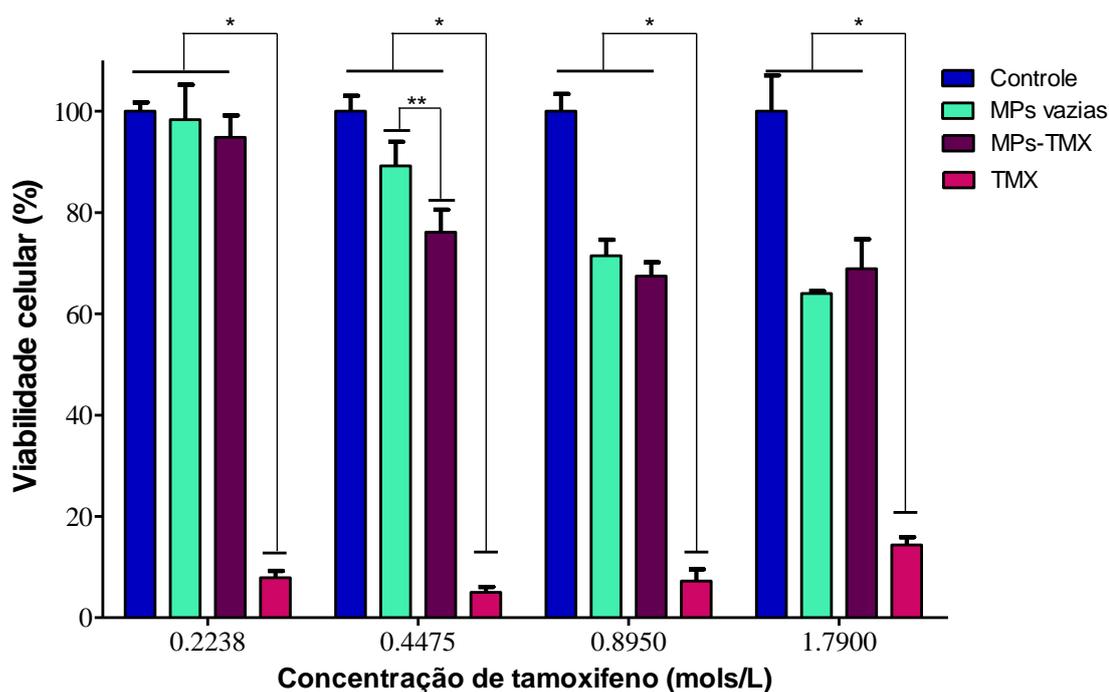


Figura 23: Ensaio de viabilidade celular utilizando como tratamento as micropartículas de Eudragit RL 100 contendo tamoxifeno encapsulado (MPS-TMX), micropartículas vazias (MPs vazias) e tamoxifeno livre (TMX) as células da linhagem MCF-7. O controle negativo consistiu da adição de meio de cultura às células. Viabilidade celular calculada pelo ensaio espectrofotométrico de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina, após 24 horas de incubação com os fármacos e o controle.

*, ** $P < 0,05$ ANOVA seguida de Pós-teste de Bonferroni.

6. DISCUSSÃO

6.1. Análise de distribuição de diâmetro hidrodinâmico e potencial ζ

A caracterização físico-química do sistema de liberação proposto, com base na distribuição de diâmetro hidrodinâmico e potencial ζ , é de grande importância para se determinar a aplicação *in vivo*, toxicidade, capacidade de atingir o sítio alvo, estabilidade das micropartículas, além de determinar o perfil de liberação do fármaco encapsulado.

A distribuição de diâmetro hidrodinâmico das partículas é um parâmetro a ser considerado para a determinação de sua aplicabilidade, uma vez que partículas com diâmetros menores apresentam maior taxa de captação intracelular em comparação com as partículas maiores (GOMES, *et. al.*, 2006). Além disso, estudos demonstraram que partículas com distribuição de tamanho de 10 a 4000 nm são

consideradas aceitáveis para a administração endovenosa (KREUTER, 2004). Conseqüentemente, a administração de partículas com diâmetro muito elevado parece ser ineficiente como sistema de liberação de fármacos devido ao acúmulo nos capilares pulmonares e difícil remoção do tecido endotelial (GOMES, *et. al.*, 2006).

A partir de modificações no método de evaporação do solvente, foram produzidas micropartículas vazias com diâmetro médio de 1,69 μm , e quando o tamoxifeno foi encapsulado produziu-se um sistema de 2,03 μm , o que não restringe a utilização do sistema proposto com base na distribuição de tamanho. A adaptação do método foi realizada no intuito de tornar viável a centrifugação e lavagem das micropartículas produzidas, visando eliminar os resíduos dos solventes utilizados.

Um ensaio realizado com micropartículas de Eudragit RL® 100 contendo nitrendipino, agente anti-hipertensivo, produzidas por meio do método de emulsificação e evaporação do solvente, apresentou partículas com tamanho superior a 14 μm (BASU e ADHIYAMAN, 2008). Dessa forma, observa-se que alterações na técnica de preparação exercem influência na distribuição de diâmetro hidrodinâmico das partículas, sendo esse um parâmetro determinante para a aplicabilidade.

As análises das amostras com a técnica de espalhamento dinâmico da luz demonstraram que as micropartículas vazias apresentaram um alto índice de polidispersividade, Pdl 0,714, o que se atribui às diversas populações de partículas com diferentes tamanhos. Já as micropartículas contendo tamoxifeno apresentaram um Pdl de 0,387, que se relaciona à menor diversidade de tamanho entre as populações quando comparadas com as micropartículas vazias. Ademais, verificou-se que as micropartículas vazias possuem diâmetro hidrodinâmico inferior ao das micropartículas carregadas com tamoxifeno, pois devido à incorporação do fármaco durante o processo de síntese do sistema foram constatadas alterações na distribuição de diâmetro das partículas. Portanto, a distribuição de tamanho das micropartículas está relacionada à eficiência de encapsulamento de fármacos (MOHANRAJ e CHEN, 2006).

A avaliação do potencial ζ auxilia na determinação da estabilidade da suspensão coloidal. Esse parâmetro reflete o potencial elétrico das partículas, o qual é influenciado pela composição do sistema microestruturado e do meio em que está

disperso (MOHANRAJ e CHEN, 2006). Sendo assim, partículas com valores abaixo de -30 mV e acima de $+30$ mV são consideradas estáveis, pois as forças repulsivas tendem a evitar agregação entre as micropartículas (MALVERN INSTRUMENTS, 2012).

Os resultados das análises de potencial ζ confirmam que as MPs-TMX apresentam carga positiva de $+58,8$ mV na superfície, assim como as MPs- vazias apresentam um valor de $+63,1$ mV. Esses valores sugerem uma boa estabilidade da suspensão coloidal, por indicarem uma baixa tendência à agregação das micropartículas em suspensão.

6.2. Análise da eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento diz respeito à quantidade de fármaco, expressa em porcentagem, incorporada e/ou adsorvida à matriz polimérica. As interações entre o fármaco e o polímero, bem como a solubilidade do fármaco na matriz polimérica, que se relaciona à composição do polímero e peso molecular, são fatores que influenciam na capacidade de encapsulamento (GOMES, *et. al.*, 2006, PANYAM, *et. al.*, 2004).

A obtenção da eficiência de encapsulamento ocorreu através da avaliação espectroscópica, resultando em um valor de 27%. A pequena quantidade de fármaco encapsulado pode ser atribuída à alta solubilidade do polímero Eudragit RL® 100 no solvente orgânico, somada à lenta solidificação das partículas, o que indica a migração do tamoxifeno para a fase orgânica durante o preparo, uma vez que o fármaco também apresenta elevada solubilidade aos solventes utilizados.

6.3. Análise da cinética de liberação do fármaco

O perfil de liberação do tamoxifeno apresentou um comportamento bifásico (figura 14). Verificou-se que no primeiro estágio, 24 horas iniciais, houve uma liberação rápida do fármaco encapsulado. O *burst* inicial de liberação do tamoxifeno, por ser um fármaco com baixa solubilidade em água, está relacionado ao fato do polímero utilizado ser bastante permeável em solução aquosa, devido à presença de grupos de amônio quaternário, favorecendo o intumescimento da matriz polimérica e difusão do fármaco encapsulado próximo à superfície das micropartículas para o meio. A segunda etapa é caracterizada por uma liberação lenta e sustentada do fármaco devido à degradação da matriz polimérica ao longo do tempo.

Estudos com Eudragit RL 100 como sistema microcarreador de nitrendipino (BASU e ADHIYAMAN, 2008), zidovudina, um agente anti-HIV (NATH, NATH e KUMAR, 2011) e estavudina, um agente anti-HIV (SAHOO, *et. al.*, 2005) apresentaram uma cinética de liberação semelhante à do sistema microestruturado proposto neste trabalho, em que foi observado um perfil de liberação bimodal caracterizado por uma rápida liberação inicial, seguido por liberação lenta e sustentada no que diz respeito à degradação da matriz polimérica ao longo do tempo e conseqüente aumento na taxa de liberação do fármaco encapsulado.

O comportamento bifásico na liberação de fármacos encapsulados pode ser atribuído à dois principais mecanismos, de modo que o primeiro relaciona-se à capacidade de intumescimento em meio aquoso e conseqüente formação de poros e canais na matriz polimérica após o preparo das micropartículas. O segundo mecanismo está associado à liberação do agente terapêutico por meio de reações de hidrólise das cadeias poliméricas devido à degradação das micropartículas (FERNÁNDEZ, *et. al.*, 2011, JAIN, *et. al.*, 2011). Dessa forma, há uma rápida liberação no início, seguida por uma liberação lenta e sustentada ao longo do tempo.

6.4. Avaliação espectroscópica na região UV/Vis

A avaliação espectroscópica na região UV/vis tem por finalidade determinar o comportamento do fármaco e do polímero isoladamente, bem como das micropartículas vazias e contendo o tamoxifeno, em relação às faixas de absorção de luz.

Foi observado no espectro do polímero livre (figura 15) um pico de máxima absorção em 213 nm característico do Eudragit RL 100, sendo também verificado um aumento na absorção de luz nessa mesma faixa de absorção em relação ao espectro das micropartículas vazias (figura 16), portanto a absorção de luz aumentada nessa faixa pode ser associada ao polímero. Contudo, ao analisar o espectro do fármaco encapsulado (figura 18), verificou-se um comportamento semelhante ao espectro da matriz polimérica (figura 16) com uma elevada absorção de luz na faixa entre 300 e 200 nm. Entretanto, ao analisar o espectro do fármaco encapsulado (figura 18), o qual quando livre em solução orgânica apresentou picos de máxima absorção na região de 240 e 277 nm, não foi possível observar aumento de absorção característico do tamoxifeno, pois como o sinal do Eudragit RL 100 é bastante intenso nessa faixa e como foi encapsulada uma pequena quantidade de

fármaco (2,7 mg), o pico de absorção do TMX pode ter sido sobreposto pelo pico do polímero. Diante disso, infere-se que a alta intensidade de espalhamento de luz da matriz polimérica sobrepõe-se ao espalhamento de luz da tamoxifeno, que possui intensidade menor. Contudo, ao promover a destruição da matriz polimérica das MPs-TMX em metanol, foi possível observar o pico característico do tamoxifeno em 277 nm e assim determinar a eficiência de encapsulamento do fármaco (figura 19).

6.5. Avaliação espectroscópica na região do infravermelho

As análises realizadas na região do infravermelho permitiram identificar, a partir dos espectros de IR do fármaco livre, do polímero e do sistema microparticulado contendo tamoxifeno, a presença do fármaco encapsulado pela determinação qualitativa de grupos funcionais presentes na estrutura química dos compostos analisados.

Assim, foi verificada a presença de picos convergentes entre as MPs-TMX e o tamoxifeno livre, o que confirma a presença do fármaco no interior da matriz polimérica e também evidencia a integridade da estrutura química do tamoxifeno, visto que os picos das MPs-TMX encontrados estão nos mesmos números de onda que os picos do fármaco isolado.

Um estudo realizado com microesferas de Eudragit® contendo diclofenaco de sódio também apresentou picos em números de onda condizentes aos picos de Eudragit RL® 100 encontrados neste trabalho (DESHMUKH e NAIK, 2013). Outro estudo utilizando poli-ε- caprolactona para encapsular tamoxifeno ao analisar o espectro de FTIR das microesferas relatou a presença de picos característicos desse fármaco nos números de onda semelhantes aos encontrados na figura 19 (JAGADEESH e DEVI, 2010).

6.6. Análise do perfil de estabilidade

A avaliação do perfil de estabilidade visa determinar o tempo em que a formulação permanece dentro dos limites pré- estabelecidos, sob as mesmas condições e características que possuía no momento em que foi preparada. Fatores ambientais como luz, temperatura e umidade, além de fatores físico- químicos intrínsecos à formulação, exercem influência sobre a estabilidade da mesma (SILVA, *et. al.*, 2009).

Dessa forma, o estudo do perfil de estabilidade das micropartículas constitui um importante parâmetro a fim de monitorar, sob condições de temperatura controlada, o comportamento relacionado às alterações da distribuição de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta (SCHAFFAZICK e GUTERRES, 2003).

O perfil de estabilidade das micropartículas (figura 21) apresentou um comportamento variável em relação ao diâmetro hidrodinâmico ao longo dos 12 dias de análise. Esse comportamento singular atribui-se aos processos de agregação das micropartículas e à desintegração da matriz polimérica. Outros estudos com sistemas poliméricos nano/microestruturados também apresentaram oscilações na distribuição de diâmetro hidrodinâmico ao longo do tempo (LAZZARI, *et.al.*, 2012, PIGNATELLO, *et. al.*, 2006, RAMPINO, *et. al.*, 2013).

A determinação do perfil de estabilidade com base na avaliação do potencial ζ das micropartículas (figura 22) possibilitou verificar alterações das cargas na superfície das partículas, o que pode ser um indicativo de agregação das mesmas ao longo do tempo, visto que oscilações nos valores de potencial ζ representam modificações na estabilidade do diâmetro hidrodinâmico das micropartículas.

Foi observada uma significativa redução do valor de potencial ζ nos dias três e quatro de análise (figura 22), visto que esse resultado pode ser atribuído às alterações abruptas de diâmetro hidrodinâmico ocorridas nos mesmos dias (figura 21). Desse modo, um valor de potencial ζ relativamente elevado é essencial para a manutenção da estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação das micropartículas (SCHAFFAZICK e GUTERRES, 2003).

Nesse sentido, é possível inferir que há similaridades nos padrões de oscilações presentes na distribuição de diâmetro hidrodinâmico (figura 21) e no potencial ζ (figura 22), em que o comportamento das cargas presentes nas superfícies das partículas no decorrer das análises corrobora o perfil oscilatório observado na distribuição de diâmetro.

6.7. Análise de viabilidade celular

O estudo com culturas celulares constitui a etapa inicial para avaliação do comportamento do sistema microparticulado *in vivo*. Para a avaliação da citotoxicidade do tamoxifeno encapsulado foram escolhidas células da linhagem MCF-7, as quais são sensíveis à ação desse fármaco por apresentarem receptores

de estrógeno que compõem o principal alvo de ação para o tamoxifeno (ZHENG, KALLIO e HÄRKÖNEN, 2007).

Foi verificado que 100% das células presentes na cultura se mantiveram viáveis quando da aplicação do controle, o que indica a confiabilidade dos resultados obtidos (figura 23). Quando baixas concentrações de micropartículas vazias (0,2238 mols/L e 0,4475 mols/L) foram aplicadas à cultura, não houve uma considerável redução da viabilidade celular. Esse efeito também foi observado nas linhagens de câncer de mama humano MCF-7, MDA-MB-231 e HMEC-184 quando tratadas com baixas concentrações de nanopartículas vazias de Eudragit RS® 100 (HUSSEIN, *et. al.*, 2013).

Entretanto, a aplicação das micropartículas vazias à cultura celular resultou em redução do número de células viáveis nas concentrações de 0, 8950 mols/L e 1,79 mols/L. Um estudo com nanocarreadores vazios formulados a partir de outro subtipo de Eudragit, RS®, também reportou a redução da viabilidade em linhagem celular de macrófagos de ratos. Tal fato foi atribuído ao aumento da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species, ROS*) e indução de estresse oxidativo através dos danos causados à mitocôndria das células tratadas com partículas vazias (EIDI, *et. al.*, 2012).

A aplicação do tamoxifeno livre à cultura propiciou uma acentuada redução da viabilidade celular quando comparada com o tratamento das células, utilizando as MPs- TMX em todas as concentrações testadas. Essa diferença nos níveis de morte celular em relação ao tratamento aplicado pode ser atribuída à pequena fração de fármaco liberado até a aplicação das micropartículas e análise da cultura celular, aproximadamente 1,62 mg, pois, apesar de ser a mesma concentração de micropartículas contendo tamoxifeno e do tamoxifeno livre, a aplicação das MPs- TMX pode ter resultado em menor disponibilidade de tamoxifeno às células, uma vez que este encontrava-se encapsulado e o TMX livre estava em contato direto com as células.

Em contrapartida, ao se realizar a análise estatística dos resultados obtidos, infere-se que não houve diferença estatística na redução da viabilidade celular quando foram aplicadas as micropartículas contendo tamoxifeno em comparação com as micropartículas vazias nas concentrações de 0,2238 mols/L, 0,8950 mols/L e 1,7900 mols/L ($P > 0,05$). Entretanto, foi verificada diferença estatística entre as MPs- TMX e as MPs vazias na concentração de 0,4475 mols/L ($P < 0,05$).

Tendo em vista essa diferença estatística na concentração 0,4475 mols/L, que diverge dos resultados estatísticos das outras concentrações testadas, sugere-se a repetição do ensaio a fim de confirmar tal resultado. No entanto, o efeito inibitório foi inferior ao efeito do tratamento com o tamoxifeno livre. Portanto, recomenda-se a repetição do ensaio com maior período de incubação das células com as MPs-TMX visando confirmar se há diferença estatística apenas para a concentração de 0,4475 mols/L, além de tentar melhorar disponibilidade do fármaco encapsulado, o que poderá resultar em uma redução acentuada do crescimento celular com um período de incubação da cultura celular com MPs-TMX por um período superior a 24 horas.

A realização de ensaios de citotoxicidade com nanopartículas poliméricas de PGLA contendo tamoxifeno avaliou a viabilidade celular da linhagem MCF-7 após a aplicação das nanopartículas por um período de 6 dias, levando a resultados satisfatórios de inibição do crescimento das células (FERNÁNDEZ, *et.al.*, 2011). Outro estudo com micropartículas de poli- ϵ - caprolactona aplicadas em cultura de células MCF-7, as quais foram incubadas por 48 horas, também apresentaram acentuada redução do padrão de viabilidade celular (JAGADEESH e DEVI, 2010).

Contudo, a atividade terapêutica do fármaco encapsulado em sistemas nano/microestruturados pode ser justificada baseada em dois princípios: o primeiro relaciona-se à capacidade de adsorção das nano/micropartículas à superfície da membrana celular, o que leva a um aumento da concentração do agente terapêutico próximo à superfície da célula, favorecendo o influxo do fármaco para o interior celular via geração de um gradiente de concentração. O segundo princípio diz respeito à capacidade das células tumorais internalizarem as nano/micropartículas de forma a permitir que o fármaco seja liberado no interior das células, o que contribui para aumentar a concentração do agente terapêutico próximo ao seu sítio de ação (FERNÁNDEZ, *et.al.*, 2011, HU, NEOH, KANG, 2006).

7. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos tem se mostrado bastante promissor com o avanço das pesquisas em nanotecnologia aplicada em sistemas nano/micro carreadores por apresentarem vantagens como a seletividade pelo seu sítio de ação e, conseqüentemente, redução dos efeitos adversos relatados nas terapias convencionais.

Atualmente, o mercado farmacêutico dispõe de diversos tipos de nano/micropartículas para o tratamento de alguns tipos de tumores, além de outras patologias. Diante disso, há uma tendência de crescimento de estudos para novas tecnologias de liberação que visam não só o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, como também a melhora dos parâmetros farmacocinéticos dos fármacos já existentes.

Esse trabalho resultou na produção e caracterização físico-química do sistema de liberação sustentada do fármaco tamoxifeno em micropartículas de Eudragit RL® 100, um polímero biocompatível. As micropartículas foram desenvolvidas a partir de uma adaptação do método de evaporação do solvente.

A distribuição de diâmetro hidrodinâmico corrobora a denominação de micropartículas, com tamanho médio de 2,03 μm e um alto valor de potencial ζ que sugere uma baixa tendência à agregação. A eficiência de encapsulamento do fármaco resultou em um baixo valor (27%), o qual foi atribuído à alta solubilidade do polímero Eudragit RL® 100 e do tamoxifeno ao solvente orgânico, que indica a migração do tamoxifeno para a fase orgânica durante o preparo.

O perfil de liberação do fármaco apresentou um comportamento bifásico caracterizado por uma rápida liberação no primeiro estágio, seguida de uma liberação lenta e sustentada ao longo do tempo.

As análises espectroscópicas na região do infravermelho possibilitaram a confirmação qualitativa da presença do tamoxifeno na matriz polimérica. A determinação quantitativa do tamoxifeno encapsulado ocorreu por espectrofotometria na região UV/Vis.

O estudo do perfil de estabilidade possibilita a simulação *in vitro* do comportamento da suspensão de micropartículas ao longo do tempo em temperatura fisiológica. Foi verificado um comportamento oscilatório com acentuada alteração de diâmetro hidrodinâmico nos dias 3 e 4 de análise, de modo que após esse período houve variações decorrentes do processo de degradação da matriz polimérica com tendência mediana à agregação.

O ensaio de viabilidade celular demonstrou que o sistema de liberação proposto atingiu o objeto inicial, em que houve uma inibição do crescimento celular das células da linhagem MCF-7. No entanto, observou-se que o fármaco livre apresentou uma taxa superior de citotoxicidade quando comparada às micropartículas contendo tamoxifeno. Esse resultado atribui-se ao fato que a aplicação das MPs-

TMX pode ter resultado em menor disponibilidade de tamoxifeno às células, uma vez que este se encontrava encapsulado e o TMX livre estava em contato direto com as células. Ao se realizar a análise estatística não foi verificada diferença estatística entre as MPs-TMX e as MPs vazias na redução na viabilidade celular, com exceção das MPs-TMX quando testada na concentração de 0,4475 mols/L.

Além disso, o tempo de incubação das células com o tratamento foi de apenas 24 horas e outros estudos com resultados mais satisfatórios apresentaram um tempo mínimo de 48 horas de incubação. Diante disso, verifica-se a necessidade de um maior período de incubação das culturas em futuras análises toxicológicas a fim de verificar o comportamento citotóxico das micropartículas ao longo do tempo, somada a necessidade de repetição do ensaio de viabilidade celular para confirmar se há diferença estatística entre a aplicação das MPs-TMX e as MPs vazias na concentração de 0,4475 mols/L.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que os objetivos propostos inicialmente foram alcançados. Entretanto, observa-se a necessidade de realização de testes futuros como avaliação morfológica por metodologia microscópica, estudos *in vitro* com linhagem celulares normais e iniciar os estudos *in vivo*. Além disso, verifica-se a necessidade de aprimoramento do método de preparo das MPs-TMX com intuito de aumentar a eficiência de encapsulamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAGUSUNDARAM, M., et. al. Microspheres as a Novel Drug Delivery System- A Review. **International Journal of ChemTech Research**. 1, n. 3, 2009. 526-534.

ALLEN, T. M., CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 65, 2013. 36–48.

ALMEIDA, V.L.D., et.al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**. 28, n.1, 2005. 118-129.

ANSARI, T., et. al. Microencapsulation of pharmaceuticals by solvent evaporation technique: A review. **Elixir Pharmacy**. 47, 2012. 8821-8827.

BARENHOLZ, Y. C. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**. 160, 2012. 117–134.

BASU, S. K., ADHIYAMAN, R. Preparation and Characterization of Nitrendipine loaded Eudragit RL 100 Microspheres Prepared by an Emulsion-Solvent Evaporation Method. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 7, n. 3, 2008. 1033-1041.

BECERRA, R. G., et. al. Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: Focus on Signaling Pathways, miRNAs and Genetically Based Resistance. **Int. J. Mol. Sci.**14, 2013. 108-145p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Formulário Terapêutico Nacional 2010**. 2. ed. Brasília, 2010. 174 e 490p.

CAMPOS, et. al. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. **European Polymer Journal**. 49, 2013. 2005–2021.

DAS, S., et al. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. 6, 2010. 318-323.

DESHMUKH, R. K., NAIK, J. B. Diclofenac sodium-loaded Eudragit® microspheres: optimization using statistical experimental design. **Journal of Pharmaceutical Innovation**. 8, 2013. 276–287.

DUCHESNEAU, C. T., et. al. Microencapsulation for the Therapeutic Delivery of Drugs, Live Mammalian and Bacterial Cells, and Other Biopharmaceutics: Current Status and Future Directions. **Journal of Pharmaceutics**. 2003. 1-20.

EIDI, H., et. al. Drug delivery by polymeric nanoparticles induces autophagy in macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**. 422, 2012. 495–503.

EVONIK INDUSTRIES. Product information, 2011. 1-2.

FERNÁNDEZ, A., et. al. Tamoxifen-Loaded Microspheres Based on Mixtures of Poly(D,L-lactide-co-glycolide) and Poly(D,L-lactide) Polymers: Effect of Polymeric Composition on Drug Release and In Vitro Antitumoral Activity. **Journal of Applied Polymer Science**. 124, 2011. 2987–2998.

FERREIRA, M. C. F., et. al. Moduladores seletivos do receptor estrogênico: novas moléculas e aplicações práticas. **FEMINA**. 39, n. 9. 2011. 433-441p.

FIGUEIREDO, E. C., DIAS, A. C. B., ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**. 44, n. 3, 2008. 361-375.

GILL, S. et. al. Nanoparticles: Characteristics, mechanisms of action, and toxicity in pulmonary drug delivery—A review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. 3, n. 2, 2007. 107-119.

GOMES, A. J., et. al. Characterization of PLGA microparticles as a drug carrier for 3-ethoxycarbonyl-2H-benzofuro[3,2-f]-1-benzopyran-2-one. Ultrastructural study of cellular uptake and intracellular distribution. **Drug Delivery**, 13, n. 6, 2006. 447-454.

GOODMAN, L. S., GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10^a. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill do Brasil, v. xxiv, 2010. 1821 p.

HAMIDI, M., AZADI, A., RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced. Drug Delivery Reviews**. 60, 2008. 1638–1649.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, 144, 2011. 646-674.

HAO, X. Prospects of cancer biotherapy. **Drug Discoveries & Therapeutics**. 5, n.3, 2011. 107-108.

HELDRING, N., et. al. Identification of Tamoxifen-Induced Coregulator Interaction Surfaces within the Ligand-Binding Domain of Estrogen Receptors. **Mol. Cell. Biol.** 24, n.8, 2004. 3445-3459p.

HIGGINS, M. J; BASELGA, J. Targeted therapies for breast cancer. **The Journal of Clinical Investigation**. 121, n. 10, 2011.

HU, F. X., NEOH, K.G., Kang, E.T. Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles. **Biomaterials**. 27, 2006. 5725–5733.

HUSSEIN, R., et. al. Unique growth pattern of human mammary epithelial cells induced by polymeric nanoparticles. **Physiological Reports**. 1, n. 4, 2013. 1-17.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER- GLOBOCAN. 2013. Disponível online em: < <http://globocan.iarc.fr>>. Acessado em 14 de fevereiro de 2014.

JAGADEESH, H. G., DEVI, K. V. Tamoxifen loaded poly (ϵ -caprolactone) based injectable microspheres for breast cancer. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 2, n. 4, 2010. 189-195.

JAIN, A. K., et. al. The effect of the oral administration of polymeric nanoparticles on the efficacy and toxicity of tamoxifen. **Biomaterials**. 32, 2011. 503-515.

JORDAN, V. C., O'MALLEY, B. W. Selective Estrogen-Receptor Modulators and Antihormonal Resistance in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**. 25, n. 36, 2007. 5815- 5824p.

JORDAN, V. C. Tamoxifen (ICI 46,474) as a target therapy to treat and prevent breast cancer. **British Journal of Pharmacology**.147, 2006. S269-S276.

JOSHI, M. Role of Eudragit in targeted drug delivery. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**. 5, n. 2, 2013. 58-62.

KATSUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 10^a ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. 1060p.

KREUTER, J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. 4, n. 5, 2004. 484- 488.

KUMAR, V., et. al. **Robbins Patologia Básica**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 1028 p.

LAZZARI, S., et. al. Colloidal stability of polymeric nanoparticles in biological fluids. **Journal of Nanoparticle Research**. 14, n. 920, 2012. 1-10.

LEE, W. L., et. al. The Role of Selective Estrogen Modulators on Breast Cancer: From Tamoxifen to Raloxifene. **Taiwan J. Obstet Gynecol**. 47, n. 1. 2008. 24-31p.

LEIBIGER, C., et. al. First Molecular Cytogenetic High Resolution Characterization of the NIH 3T3 Cell Line by Murine Multicolor Banding. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. 61, n. 4, 2013. 306 –312.

LEWIS, J. S., JORDAN, V. C. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): Mechanism of anticarcinogenesis and drug resistance. **Mutation Research**. 591, 2005. 247-263p.

MALVERN INSTRUMENTS. **A Basic Guide to Particle Characterization**. [S.l.]: [s.n.], 2012. 26p.

MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer Nano Series User Manual**. [S.l.]: [s.n.], 2004. 270 p.

MCF-7: linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano. Disponível online em: < <http://www.mcf7.com/>> Acessado em 13 de abril de 2014.

MIELE, E., et. al. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. **International Journal of Nanomedicine**. 4, 2009. 99–105.

MINISTÉRIO DA SAÚDE- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2012. 129p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2014 - Incidência de câncer no Brasil**. INCA. Rio de Janeiro, p. 124. 2014.

MOHANRAJ, V.J., CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 5, n.1, 2006. 561-573.

NATH, B., NATH, L.K., KUMAR, P. Preparation and in vitro dissolution profile of zidovudine loaded microspheres made of Eudragit RS 100, RL 100 and their combinations. **Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research**. 68, n.3, 2011. 409-415.

NCI- NATIONAL CANCER INSTITUTE. (Kleinsmith, L. J., KERRIGAN, D., KELLY, J.) Understanding Estrogen Receptors, Tamoxifen, and Raloxifene, 2010. Disponível online em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/estrogenreceptors/estrogen2010.pdf>> Acessado em 26 de março de 2014.

NETO, Q. A. D. M., et. al. Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa de dibenzoilmetanos α -substituídos quanto à atividade anticâncer da mama (linhagem celular MCF7). **Revista Brasileira de Cancerologia**. 52, n.4, 2006. 345-357p.

NIH (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. NATIONAL CANCER INSTITUTE). **What You Need To Know About Breast Cancer**. NIH Publication, n.12.1556, 2012.

NIH (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. NATIONAL CANCER INSTITUTE). **What You Need To Know About Breast Cancer**. NIH Publication, n.09.1556, 2009.

NIH (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. NATIONAL CANCER INSTITUTE). **What You Need To Know About Breast Cancer**. NIH Publication, n.05.1556, 2005.

NIKAN, V. K, et. al. Eudragit a versatile polymer: A review. **Pharmacologyonline**. 1, 2011. 152-164.

OLIVEIRA, R. B., LIMA, E. M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia**. 3, n.1, 2006. 29-35.

PANYAN, J., et. al. Solid-State Solubility Influences Encapsulation and Release of Hydrophobic Drugs from PLGA/PLA Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 93, n.7, 2004. 1804-1814.

PEER, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature**, 2, 2007. 751-760.

PERES, L. A. B., et. al. Padronização do teste do MTT em modelo de preservação a frio como instrumento de avaliação da viabilidade celular renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. 30, n. 1, 2008. 48-53.

PIGNATELLO, R., et. al. Preparation and characterization of Eudragit Retard nanosuspensions for the ocular delivery of cloricromene. **AAPS PharmSciTech**. 7, n. 1, 2006. 1-7.

RAMPINO, A., et. al. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**. 455, 2013. 219–228.

RATILAL, D. A., et. al. A Review on: Sustained Released Technology. **International Journal of Research in Ayrveda & Pharmacy**. 2, n. 6, 2011. 1701-1708.

RAWAT, M. et al. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. 29, n. 9, 2006. 1790-1798.

RIBEIRO, C. M. S., GOMES, A. J., NASCIMENTO, P. G. B. D. **Desenvolvimento de sistema de liberação controlada de cisplatina em micropartículas de goma guar**. 2013. 58p. Monografia de conclusão de curso. Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Ceilândia, 2013.

RIGGINS, R. B., et. al. Pathways to Tamoxifen Resistance. **Cancer Lett**. 256, n. 1. 2007. 1-24p.

RUBIN, E., et. al. **Rubin, Patologia: Bases clinicopatológicas da medicina**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1625p.

SAHIL, et. al. Microsphere: A Review. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**. 1, n. 4, 2011. 2231-2781.

SAHOO, S. K., et. al. Formulation and *in vitro* Evaluation of Eudragit[®] Microspheres of Stavudine. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 4, n. 1, 2005. 369-375.

SAHOO, S. K., PARVEEN, S., PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine, Nanotechnology, Biology and Medicine**. 3, 2007. 20-31p.

SAJJA, H. K, et. al. Development of Multifunctional Nanoparticles for Targeted Drug Delivery and Noninvasive Imaging of Therapeutic Effect. **Current Drug Discovery Technologies**. 6, n.1, 2009. 43-51.

SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. 26, n. 5, 2003. 726-737.

SHASTRI, V. P. Non-Degradable Biocompatible Polymers in Medicine: Past, Present and Future. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. 4, 2003. 331-337.

SIGMA ALDRICH. Product Information, 2014. 1-3.

SILVA, K. E. R., et. al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 30, n. 2, 2009. 129-135.

SILVERMAN, J. A., DEITCHER, S. R. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. **Cancer Chemother Pharmacol**. 71, 2013. 555–564.

SONJE, A., CHANDRA, A. Comprehensive review on Eudragit polymers. **International Research Journal of Pharmacy**. 4, n. 5, 2013. 71-74.

TAO, K., et. al. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. **BMC Cancer**. 8, n. 228, 2008. 1-19.

VENDITTO, V. J.; JR., F. C. S. Cancer nanomedicines: So many papers and so few drugs! **Advanced Drug Delivery Review**. 65, 2013. 80–88.

VILAR, G., PUCHE, J. T., ALBERÍCIO, F. Polymers and Drug Delivery Systems. **Current Drug Delivery**. 9, n. 4, 2012. 1-28.

VILLANOVA, J. C. O., ORÉFICE, R. L., CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. 20, n. 1, 2010. 51-64.

VILOS, C., VELASQUES, L. A. Therapeutic Strategies Based on Polymeric Microparticles. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2012. 1-9.

WEINBERG, R.A. **A biologia do Câncer**. Tradução Bruna Selbach. Porto Alegre: Artmed, 2008. 864 p.

WILCZEWSKA, A., et. al. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**. 64, 2012. 1020-1037.

YANG, G., et. al. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. **Pharmacology & Therapeutics**. 139, 2013. 392-404p.

YE, et. al. Antitumor effect and toxicity of Lipusu in rat ovarian cancer xenografts. **Food and Chemical Toxicology**. 52, 2013. 200–206.

ZHANG, L., et. al. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. 83, n. 5, 2008. 761-769.

ZHENG, A., KALLIO, A., HÄRKÖNEN, P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. **Endocrinology**. 148, n. 6, 2007. 2764–2777.